

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Section de chimie

Département de biochimie

Prof. J.-P. Bargetzi

---

DEUX RIBONUCLEASES EXOPLASMODIALES DE PHYSARUM  
POLYCEPHALUM : PURIFICATION, PROPRIETES ET  
SPECIFICITE.

THÈSE

PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ  
DE GENÈVE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES  
BIOCHIMIQUES.

PAR

DANIEL PILLY  
DE GENÈVE

Thèse No 1828

1977

GENEVE

Imprimerie de la Section de Physique

1978



UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Section de chimie

Département de biochimie

Prof. J.-P. Bargetzi

---

DEUX RIBONUCLEASES EXOPLASMODIALES DE PHYSARUM  
POLYCEPHALUM : PURIFICATION, PROPRIETES ET  
SPECIFICITE.

THÈSE

PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ  
DE GENÈVE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES  
BIOCHIMIQUES.

PAR

DANIEL PILLY  
DE GENÈVE

Thèse No 1828

GENEVE

Imprimerie de la Section de Physique

1978

La faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs J.P. BARGETZI, professeur ordinaire et directeur de thèse, M. BILLETER, professeur (Université de Zürich) et H. TURLER, chef de travaux (dépt. de biologie moléculaire), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

GENEVE, le 25 juillet 1977

Le doyen : Bernard LEVRAT

Thèse N<sup>O</sup> 1828



## TABLE DES MATIERES.

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abréviations                                                                   | 1  |
| I. INTRODUCTION                                                                | 2  |
| 1. Généralités, définitions                                                    | 2  |
| 2. Spécificité des ribonucléases et séquence du RNA                            | 5  |
| 3. Les ribonucléases de <i>Physarum polycephalum</i>                           | 7  |
| II. PREPARATION DES RNASES I ET II                                             | 9  |
| 1. Matériel, préparations préliminaires, méthodes                              | 9  |
| 2. Extraction et purification                                                  | 10 |
| 3. Résultats, discussion                                                       | 17 |
| III. QUELQUES PROPRIETES DES RNASES DE <i>P. POLYCEPHALUM</i>                  | 21 |
| 1. pH optimum                                                                  | 21 |
| 2. Facteurs affectant l'activité                                               | 22 |
| 3. Influence de la température sur l'activité                                  | 23 |
| 4. Poids moléculaire                                                           | 25 |
| 5. Point isoélectrique                                                         | 26 |
| 6. Discussion                                                                  | 28 |
| IV. SPECIFICITE DES RNASES PHY I ET PHY II                                     | 30 |
| A. <u>Introduction</u>                                                         | 30 |
| 1. Principe des analyses                                                       | 30 |
| 2. Chromatographie en phase liquide et sous haute pression                     | 34 |
| B. <u>Spécificité de la RNase I</u>                                            | 35 |
| 1. Matériel, méthodes                                                          | 35 |
| 2. Résultats                                                                   | 39 |
| 3. Discussion                                                                  | 44 |
| C. <u>Spécificité de la RNase II</u>                                           | 48 |
| 1. Matériel, méthodes                                                          | 48 |
| 2. Résultats                                                                   | 54 |
| 3. Discussion                                                                  | 60 |
| V. MESURE DE QUELQUES CONSTANTES CINETIQUES                                    | 65 |
| 1. Introduction                                                                | 65 |
| 2. Détermination du $K_M$ de UpC, ApC, GpU par la méthode spectrophotométrique | 66 |

TABLE DES MATIERES (suite)

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3. Détermination des constantes cinétiques par la méthode chromatographique..... | 67 |
| 4. Détermination des constantes d'inhibition des nucléotides cycliques.....      | 72 |
| 5. Discussion.....                                                               | 73 |
| VI. CONCLUSION.....                                                              | 75 |
| Bibliographie.....                                                               | 79 |

Abréviations.

|          |                                           |
|----------|-------------------------------------------|
| RNase    | : ribonucléase                            |
| Pase     | : phosphatase                             |
| BSA      | : albumine de serum bovin                 |
| Tris     | : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane       |
| SDS      | : dodécyl sulfate de sodium               |
| PM       | : poids moléculaire                       |
| UV       | : ultra violet                            |
| A ou Ado | : adénosine                               |
| C ou Cyd | : cytidine                                |
| G ou Guo | : guanosine                               |
| U ou Urd | : uridine                                 |
| N, N'    | : nucléoside quelconque                   |
| Np       | : nucléoside 3'-phosphate                 |
| N > p    | : nucléoside 2':3' phosphate cyclique     |
| NpN'     | : dinucléoside monophosphate : N3'-p-5'N' |
| Pyd      | : nucléoside à pyrimidine                 |
| Puo      | : nucléoside à purine.                    |

## I. INTRODUCTION.

### 1. Généralités, définitions.

Les enzymes nucléolytiques catalysent la dégradation des acides nucléiques : DNA et RNA. Ils sont subdivisés en plusieurs classes selon le type de réaction qu'ils catalysent ou la spécificité dont ils font preuve à l'égard de leur substrat (6,7). Privat de Garihle (7) distingue :

- Nucléases : catalyse de la coupure des liaisons internucléotidiques diester-phosphate.
- Nucléotidases : catalyse de l'hydrolyse des liaisons monoester-phosphate avec libération de nucléoside et de phosphate minéral (phosphomonoesterase).
- Nucléosidases : catalyse de l'hydrolyse des liaisons N-glycosidiques avec libération de bases nucléiques et de pentoses.

Les nucléases elles-mêmes peuvent être réparties en deux grandes classes :

- Endonucléases : fragmentation interne de la chaîne polynucléotidique avec formations d'oligonucléotides et de mononucléotides.
- Exonucléases : attaque de la chaîne par une extrémité, avec libération successive de mononucléotides. Cette classe comprend principalement les phosphodiesterases.

On range les ribonucléases dans la classe des endonucléases, qu'on subdivise en trois sous-classes :

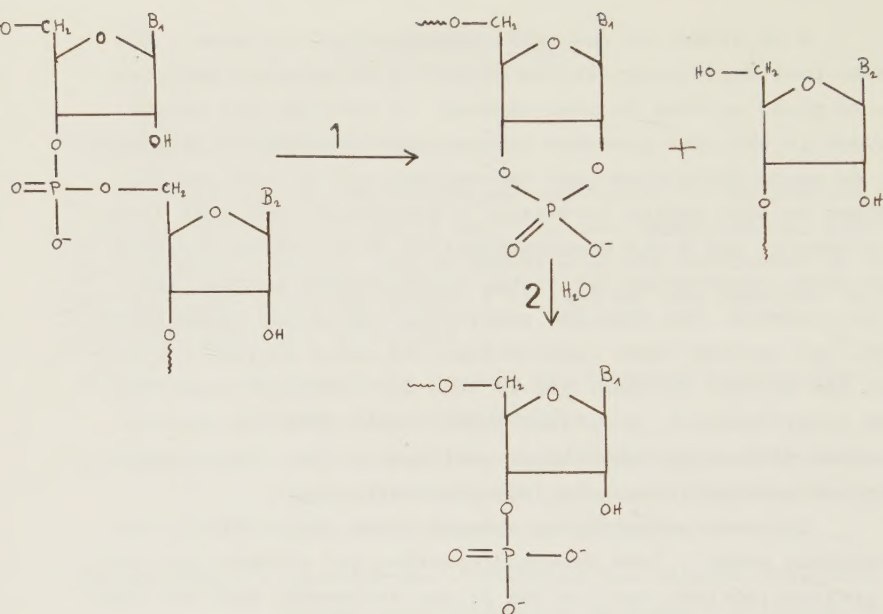
- Nucléases aspécifiques quant à la nature du pentose (dépolymérisation du DNA et du RNA)
- Desoxyribonucléases (action sur le DNA uniquement)
- Ribonucléases (action sur le RNA uniquement).

A ce stade, on peut déjà remarquer que le terme ribonucléase peut être interprété ou défini de différentes manières. Si on le prend au sens le plus général, il désigne tout enzyme attaquant le RNA. Une première restriction intervient si l'on écarte de cette définition tous les enzymes qui ne sont pas des nucléases au sens défini ci-dessus, c'est-à-dire ceux dont l'action n'aboutit pas à une dépolymérisation de la chaîne nucléotidique. Cette restriction est faite, implicitement ou non, par tous les auteurs. Une deuxième restriction est aussi communément admise, qui accepte comme ribonucléase les seuls enzymes n'hydrolysant que le RNA, excluant par là ceux qui attaquent soit DNA et RNA indifféremment (nucléases aspécifiques quant au pentose), soit toute liaison phosphodiester nucléique ou non, par exemple le bis-p-nitrophenylphosphate (phosphodiesterases).

Ces deux restrictions amènent Egami (6) à définir une ribonucléase comme : "une phosphodiesterase qui attaque les liaisons internucléotides dans le RNA et ses fragments, mais non dans le DNA, ni au niveau des liaisons diesterphosphate quelconques comme le bis-p-nitrophenylphosphate." Il classe ensuite les ribonucléases de trois façons différentes, selon le critère utilisé : mode d'action, produits de réaction, spécificité envers le substrat. La définition et la classification donnée par Egami paraît la plus satisfaisante, car elle permet de tenir compte de la grande diversité des ribonucléases, entre autre du fait que certaines d'entre elles sont des exonucléases (RNase  $U_4$ , RNase II de E. coli, etc.).

Cependant, comme le souligne Egami (6), la plupart des ribonucléases peuvent être définies selon les critères suivants :

- L'attaque du RNA est endonucléolytique : les produits formés sont des oligonucléotides de taille plus faible que la chaîne polynucléotidique initiale.
- La dégradation du RNA se fait selon le schéma ci-dessous :



Le mécanisme de la réaction est composé de deux étapes élémentaires. La première voit s'opérer un transfert du groupement ortho-phosphate de l'oxygène 5' du nucléotide portant la base  $B_2$  à l'oxygène 2' du nucléotide portant la base  $B_1$ . La deuxième étape, où le phosphate est transféré de l'oxygène 2' au solvant, est dans les conditions physiologiques une hydrolyse.

La première étape conduit donc à la rupture de la molécule de RNA, avec libération d'une extrémité 5'OH libre d'une part et d'une extrémité 2':3' phosphate (cyclique) d'autre part. Le résultat de la deuxième étape de la réaction est l'ouverture du cycle 2':3' phosphate, avec libération de nucléoside 3' phosphate. L'hydrolyse du cycle aboutissant au seul isomère 3' phosphate est caractéristique de la réaction enzymatique.

L'intermédiaire 2':3' phosphate cyclique est stable et la deuxième étape de la réaction catalysée par la RNase est beaucoup plus lente que la première.

Ces deux critères (endroit du clivage et mécanisme), ajoutés à celui de la spécificité pour le seul RNA nous paraissent suffisants pour définir sans équivoque les ribonucléases. Celles

qui font l'objet de ce travail sont conformes à ces critères, comme d'ailleurs les RNases typiques que sont la RNase pancréatique, la RNase  $T_1$ , etc.

La commission des enzymes (IUB) (7) a classé les ribonucléases cyclisantes dans le groupe des Nucleotidyl-Transferases 2.7.7., avec le numéro 2.7.7.17. pour les RNases non spécifiques quant aux bases : Polyribonucléotide 2-oligonucléotide-transférase (cyclisante). Il faut remarquer que le terme "non spécifique" employé ici ne veut pas dire qu'il n'y a aucune spécificité, mais seulement que celle-ci n'est pas absolue, comme elle l'est pour la RNase  $T_1$  ou la RNase pancréatique, qui portent d'autres numéros dans la classification de la commission des enzymes.

## 2. Spécificité des ribonucléases et séquence du RNA.

Les ribonucléases endonucléolytiques cyclisantes peuvent avoir à l'égard des bases nucléiques une spécificité très marquée. La première ribonucléase purifiée et étudiée complètement, celle du pancréas de boeuf (50), possède la propriété de ne couper que les liaisons pyrimidine-pyrimidine et pyrimidine-purine dans le RNA (CpN et UpN, où N est un nucléotide quelconque). L'enzyme a donc la possibilité de reconnaître la base portée par le nucléotide situé du côté 3'P de la liaison diester-phosphate qui sera coupée par son action catalytique. Cette propriété a conduit de très nombreux groupes, par analogie avec les protéases, à rechercher des ribonucléases spécifiques qui rendraient possible une étude de la séquence des RNA. En effet, seuls les enzymes sont capables de couper le RNA sélectivement à un endroit déterminé. Comme les ribonucléases sont présentes dans tous les organismes vivants, on peut espérer trouver par de larges recherches des enzymes ayant une spécificité telle que l'enzyme n'agisse que sur un nombre restreint et bien défini de liaisons, et permette ainsi d'élucider la séquence du RNA. Les travaux d'Egami & al. (5) en particulier ont révélé l'existence d'une multitude de ribonucléases présentes dans les microorganismes. Parmi celles-ci, la RNase  $T_1$  d'*Aspergillus oryzae* (ascomycète employé par les japo-

nais dans la fabrication de l'alcool de riz à cause de l'amyrase qu'elle secrète) coupe spécifiquement toutes les liaisons GpN, où N est un nucléotide quelconque, et celles-là seulement. Cette propriété s'est révélée assez répandue parmi les RNases des organismes inférieurs, dont la plupart sont cependant non spécifiques ou purines spécifiques (n'hydrolysant que les liaisons PupN). A part les deux revues d'Egami (5,6), une revue très complète a été publiée en 1969 par Barnard (9), qui énumère une soixantaine de ribonucléases. Depuis lors, de très nombreuses publications ont décrit la purification et la spécificité de nouvelles RNases (10-18), dont certaines ont des spécificités intéressantes : p.ex. la RNase de *Citrobacter* qui ne coupe que poly U, mais pas poly A, poly G ni poly C (14), ou celle d'*Enterobacter* qui ne coupe qu'après C et A (15,16). L'application de ces deux RNases au RNA naturel semble toutefois peu utile pour les travaux de séquence, car leur spécificité paraît moins claire avec le RNA comme substrat qu'avec les homopolynucléotides.

D'autres tentatives d'obtenir un clivage du RNA à certains endroits bien déterminés ont été faites par modification de la RNase pancréatique (19) ou du substrat (20). En effet, la RNase pancréatique carboxyméthylée au niveau de la lysine 41 (CM-RNase :  $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine-41-pancreatic ribonuclease A), située, comme l'ont montré les études cristallographiques (50), au centre actif de l'enzyme, possède une spécificité restreinte par rapport à l'enzyme natif. La CM-RNase n'attaque que les liaisons PypPu, avec une préférence nette pour les liaisons PypA, laissant intactes les liaisons PypPy. Les modifications du substrat, d'autre part, ont pour effet de restreindre l'activité de la RNase agissant sur lui. Par exemple, il est possible de fixer un groupe méthoxy sur le N4 de la cytidine, sans modifier les autres résidus. La RNase pancréatique, agissant sur un RNA dont les cytidines sont ainsi modifiées, ne coupera plus que les liaisons UpN et n'attaquera donc pas les liaisons CpN. Ces méthodes, théoriquement efficaces, présentent toutefois l'inconvénient de réclamer une série d'opérations chimiques que la faible quantité

de RNA disponible rend difficile à réaliser.

L'utilisation des ribonucléases dans l'étude de la séquence du RNA a été décrite exhaustivement par Holley (21) et plus récemment par Brownlee (22). Le principe général en est le suivant. Le RNA est d'abord soumis à une digestion complète par la RNase  $T_1$  ou la RNase pancréatique. Les fragments obtenus, en nombre fixe et restreint, sont séparés par électrophorèse dans deux dimensions, et leur séquence est déterminée en utilisant la phosphodiesterase de venin s'ils sont suffisamment petits, ou en les hydrolysant avec la RNase pancréatique si ils sont de plus grande dimension, afin de les subdiviser et les rendre accessibles à l'analyse. Certaines séquences sont toutefois difficiles à déterminer, en particulier celles qui contiennent des suites d'un même nucléotide ou des séries de pyrimidines. Dans ces cas, des RNases coupant toutes les liaisons sauf certaines, en petit nombre et bien déterminées, permettent de résoudre ces types de séquences. L'isolement et l'analyse de séries de A, par exemple, peut être obtenue par l'action successive de la RNase  $T_1$  et de la RNase pancréatique. L'isolement de groupes de C,U ou G demeure encore plus délicat, de même que l'analyse des enchaînements de pyrimidines résultants de la digestion du RNA par la RNase  $T_1$ .

### 3. Les ribonucléases de Physarum polycephalum.

En 1969 r. Braun (23), au cours de travaux sur le cycle mitotique de Physarum polycephalum, une moisissure faisant partie de la classe des myxomycètes, mit en évidence une ribonucléase excrétée dans le milieu de culture. Il a montré que cette ribonucléase extracellulaire avait un pH optimum d'activité d'environ 4, un poids moléculaire de 31 000, qu'elle attaquait le RNA mais non le DNA, qu'elle était une endonucléase cyclisante, et que poly C était assez résistant à son action hydrolytique.

Le présent travail a pour but d'isoler et de purifier à un haut degré cette ribonucléase, et de définir avec précision sa spécificité, dans l'espoir de confirmer l'intérêt qu'elle peut avoir dans l'étude des séquences de RNA. Cette recherche

nous a conduits à isoler et caractériser en outre une deuxième ribonucléase et une phosphomonoesterase (26). La RNase décrite par Braun a été appelée RNase Phy I, et l'autre RNase Phy II dans ce travail.

D'autres travaux ont été consacrés aux RNases de *P. polycephalum* par Hiramuru & al. (24), suggérant l'existence de 4 RNases, mais intracellulaires et dont les propriétés diffèrent largement de celles des RNases extracellulaires décrites dans ce travail. D'autre part, Farr & al. (25) ont publié en 1972 une méthode de purification de la RNase extracellulaire de *P. polycephalum*, mais sans observer la présence de la RNase II ni de la phosphatase que nous décrivons.

Le présent travail est divisé en quatre parties : dans la première partie est exposée la purification des deux ribonucléases extracellulaires de *Physarum polycephalum*, dans le deuxième partie quelques caractéristiques de ces deux enzymes. La troisième partie décrit la nature de la spécificité des deux RNases envers les dinucléosides monophosphates et le RNA utilisés comme substrat, et, la dernière partie présente quelques résultats d'expériences sur le comportement cinétique de la RNase Phy I dans la catalyse de divers transferts de phosphate ou hydrolyses.

## II. PREPARATION DES RNASES I ET II.

### 1. Matériel, préparations préliminaires, méthodes.

Les Sephadex G 200, G 25, SP C-25 proviennent de Pharmacia (Uppsala, Suède). Les celluloses substituées DE-11 et DE-52 de Whatmann (Angleterre). L'agarose:5'-(p-aminophenylphosphoryl) Uridine 2'(3') phosphate de Miles-Yeda (Rehovot, Israël). Les réactifs et produits chimiques, qualité pour analyse, de Merck (Darmstadt, Allemagne) ou Fluka (Buchs, Suisse).

#### Purification du RNA.

Le RNA commercial de levure provient de Fluka. Il est purifié comme suit : 5 gr. de RNA sont dissous dans 100 ml. d'eau désionisée (la dissolution est facilitée en maintenant le pH entre 6 et 7 par adjonction de petites quantités de NaOH dilué), puis chromatographiés sur une colonne de Sephadex G 25 fine (5/60 cm., prééquilibrée dans un tampon acétate d'ammonium 1 mM, pH 4,5, élution par le même tampon). Après passage du volume vide, une fraction de 200 ml. est recueillie et lyophilisée. Le poids moléculaire moyen du RNA ainsi obtenu est de 9000.

#### Mesure de l'activité de la ribonucléase.

L'activité des RNases est mesurée selon la méthode d'Anfinsen & al. (1), basée sur la différence de solubilité entre le RNA et les oligonucléotides plus courts en milieu acide. Nous avons légèrement modifié cette méthode, pour l'adapter à nos RNases: 0,5 ml. de RNA en solution à 4mg/ml. dans un tampon à pH = 4,5 (acétate de Na 0,1 M) pour la Rnase I et à pH = 3,1 (citrate de Na 0,1 M) pour la Rnase II sont mélangés à 0,5 ml. de solution d'enzyme. Ce mélange est incubé environ 10 min. à 40°C, puis la réaction est arrêtée par l'adjonction de 0,25 ml. solution acide et dénaturante (2 gr.  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{UO}_3$  + 166 ml.  $\text{H}_2\text{O}$  + 84 ml.  $\text{HClO}_4$  à 70 % dans l'eau). Après agitation, le RNA insoluble est éliminé par centrifugation (10 min. à 2000 t/min.), et 0,1 ml. de surnageant sont dilués dans 3 ml. d'eau. L'absorbance à 260 nm est mesurée contre un blanc ayant subi les mêmes opérations, mais où la solution d'enzyme est remplacée par de l'eau.

L'activité par ml. de solution d'enzyme est définie par l'absorbance à 260 nm. mesurée dans les conditions ci-dessus multipliée par la coefficient de dilution de la solution d'enzyme pris égal à 75) et divisée par le nombre de minutes d'incubation :

$$\text{Activité} = \frac{A_{260} \times 75}{\text{temps d'inc.}} \quad \text{Unités/ml.} \cdot \text{min.} \quad 1)$$

1 unité met en solution environ 35 % de RNA par minute et elle représente l'activité d'environ  $10^{-2}$  nanomoles de RNase

#### Culture du Physarum polycephalum.

Les cultures de Physarum ont été produites à petite échelle par R. Braun (23) et à grande échelle par J. Nüesch et J.A. Auden chez Ciba-Geigy à Bâle, qui nous ont fourni le milieu de culture débarrassé des cellules et débris cellulaires par centrifugation.

Les cultures proviennent d'une souche pure M3c IV de Physarum polycephalum d'une culture des USA. Le milieu de culture est celui de Daniel et Baldwin (27). Les organismes ont été cultivés dans un fermenteur aéré, à l'obscurité, à un pH n'excédant pas 5,2 et à une température de 22°C pendant 48 à 72 heures. Après une période de croissance correspondant en moyenne à 4 ou 5 cycles mitotiques, les microplasmodes ont été éliminés par centrifugation à 500 g pendant 10 min. Le milieu surnageant a été congelé et conservé à -20°C pendant plusieurs mois.

## 2. Extraction et purification.

Toutes les opérations sont accomplies en chambre froide à 4°C.

### a) Centrifugation.

6 litres de milieu de culture de Physarum sont centrifugés à 15000 t/min dans un rotor Sorvall à flux continu. Le surna-

1) malgré la convention, nous avons préféré prendre la minute comme unité de temps, car elle est plus adaptée à nos conditions exp.

geant est recueilli et dilué à 20 litres avec du tampon Tris-HCl pH 7,5 (concentration finale en tampon : 20 mM). 4 ml. de Triton X-100 (26) sont ajoutés.

b) Extraction par adsorption sur DEAE-cellulose.

3 fractions de 500 ml. de suspension de cellulose DE-11 (150 gr./lt, soit env. 150 meq./l.) équilibrée dans le tampon Tris-HCl pH 7,5 20mM sont ajoutées toutes les 30 minutes sous agitation constante. 30 min. après l'adjonction de la troisième portion de cellulose, l'agitation est arrêtée pour laisser décanter la solution. Le surnageant est recueilli par siphonnage. La cellulose est lavée avec 3 l. de tampon qui, après décantation, sont ajoutés au précédent. Pour achever la décantation, la cellulose est centrifugée à 5000 t/min. pendant 10 min. et le surnageant ajouté aux surnageants précédents. La solution obtenue avec les différents surnageants est soumise à une nouvelle extraction identique à la première.

Les culots de cellulose résultant de la centrifugation sont suspendus dans une solution de NaCl (concentration finale en NaCl : 1 M). La suspension est agitée, décantée et le surnageant recueilli. La cellulose est à nouveau centrifugée pour achever la décantation puis le culot resuspendu dans une solution fraîche de NaCl. La phase liquide est récoltée, réunie à la précédente (volume total = 1800 ml.) et dialysée pendant 8 heures contre de l'eau desionisée courante.

c) Concentration.

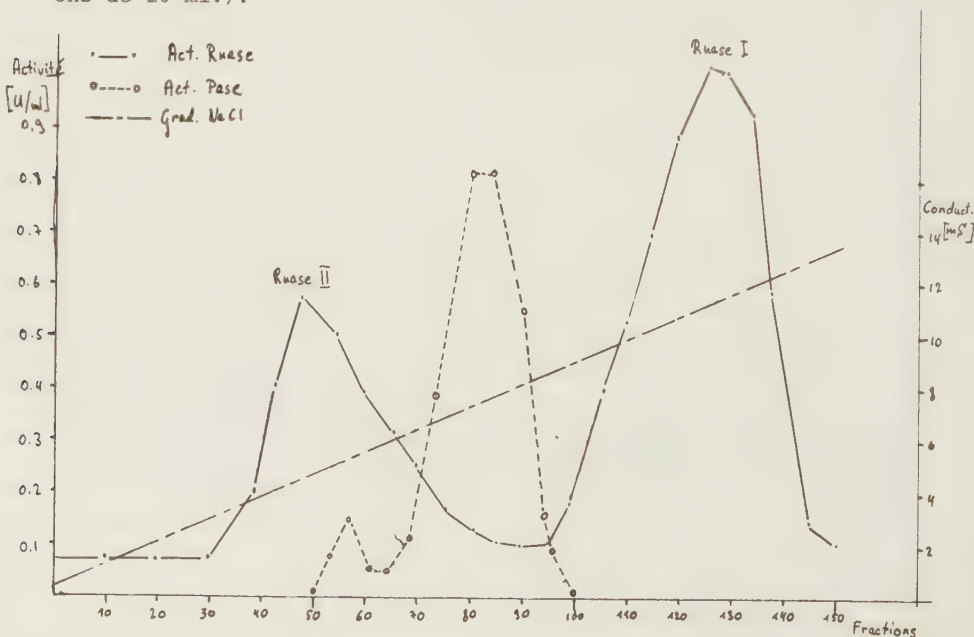
500 ml. de suspension de cellulose DE-11 (comme ci-dessus) sont ajoutés au dialysat dont le pH a été rammené à 7,5 avec du Tris-OH 1 M et le mélange est agité 30 min. Après décantation le surnageant est éliminé. La cellulose est lavée plusieurs fois par resuspension et décantation dans le tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5 et versée dans une colonne de 5 cm. de diamètre. La RNase active est alors éluee par le passage d'une solution de NaCl 1 M à travers la colonne.

d) Chromatographie sur Sephadex G 25.

L'éluat contenant l'activité Rnase (423,5 ml.) est dilué à 800 ml. avec de l'eau desionisée puis passé en deux fois à travers une colonne de Sephadex G 25 coarse (12/100 cm., élution avec de l'eau). La conductivité de l'effluent, mesurée avec une cellule à flux continu, permet de détecter la sortie des protéines exclues du gel. L'effluent contenant les protéines est récolté jusqu'à ce que la conductivité monte brusquement (moment correspondant à la sortie du sel). Le volume total de la solution dessalée est de 2750 ml.

e) Chromatographie sur cellulose DE-52.

La solution dessalée, dont le pH a été abaissé à 4,5 par de l'acide acétique, est passé à travers une colonne de cellulose Whatmann DE-52 (3/15 cm., équilibrée dans l'acétate de sodium 10 mM pH = 4,5). La RNase active est retenue par la cellulose dans ces conditions. Après lavage par 200 ml. du tampon d'équilibrage, l'élution est conduite par un gradient de NaCl (0 - 0,3 M, volume total = 2 litres, débit : 50ml/h., fractions de 10 ml.).

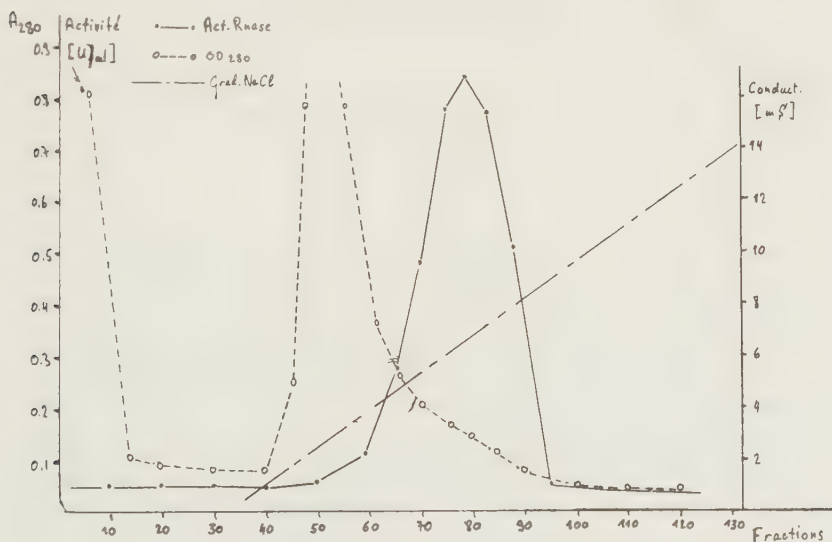


Les fractions contenant RNase II et phosphatase acide d'une part (405 ml.), et celles contenant la RNase I d'autre part (470 ml.) sont récoltées et traitées séparément

### Rnase I

#### f 1) Chromatographie sur SP-Sephadex.

La fraction contenant la Rnase I est dessalée par dialyse contre de l'eau désionisée courante, puis son pH est ajusté à 3,5 avec de l'acide citrique 1 M. Elle est chromatographiée sur une colonne de SP-Sephadex C 25 (2,5/15 cm., équilibrée dans du tampon citrate de sodium 10 mM pH = 3,5). La Rnase I est éluée par un gradient de NaCl (0 - 0,35 M dans le même tampon, vol. tot. 1 lt, débit 86 ml/h, fract. de 10 ml.). La RNase II contaminante est éluée au début de la chromatographie, bien séparée de la RNase I.



Les fractions contenant la Rnase I sont rassemblées (210 ml.) et dialysées contre de l'eau désionisée courante pendant 8 heures.

### g 1) Chromatographie d'affinité.

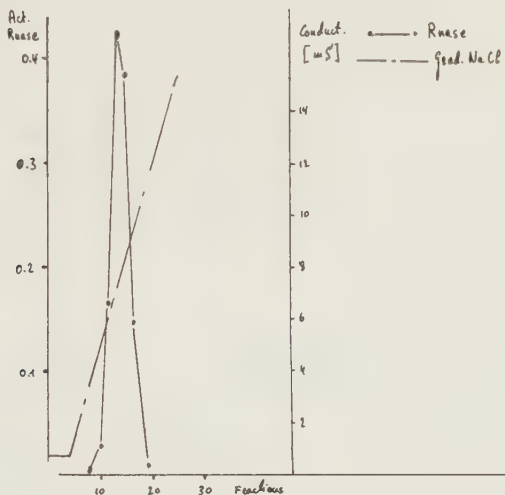
La solution de Rnase I dialysée est amenée à pH 5,2 avec de l'acide acétique dilué et passée sur une colonne de 20 ml. d'agarose : 5'-(p-aminophenyl phosphoryl-)uridine 2'(3') phosphate (2,5 4cm., équilibrée dans un tampon acétate de sodium 20 mM, pH = 5,2). L'élution est faite par un gradient de guanidine-HCl 0,1 - 0,5 M dans le tampon d'équilibrage (débit : 22,5 ml/h., fractions de 2,5 ml.). Les fractions contenant la Rnase I (145 ml.) sont réunies et dialysées contre 10 litres de tampon acétate de sodium pH 4,5 10 mM.



### h 1) Concentration et conservation.

La solution de Rnase I est passée sur une colonne de cellulose DE-52 (15 cm., équilibrée dans du tampon acétate de sodium 10 mM pH = 4,5). La Rnase I est éluée par un gradient de NaCl dans le même tampon de 0 à 0,25 M (volume total = 200ml., débit : 22 ml/h., fractions de 2,2 ml). Les fractions contenant la Rnase I sont réunies (25 ml.) et additionnées de glycérol à 82 % jusqu'à une concentration finale en glycérol de 40 %, de manière à pouvoir être conservées à -18°C sans congéla-

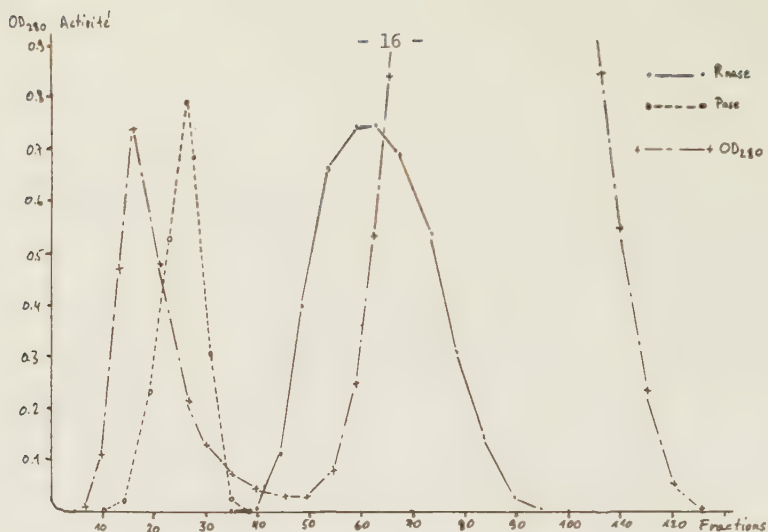
tion. Cette solution est utilisée pour les toutes les expériences destinées à examiner les propriétés de la Rnase I.



## Rnase II

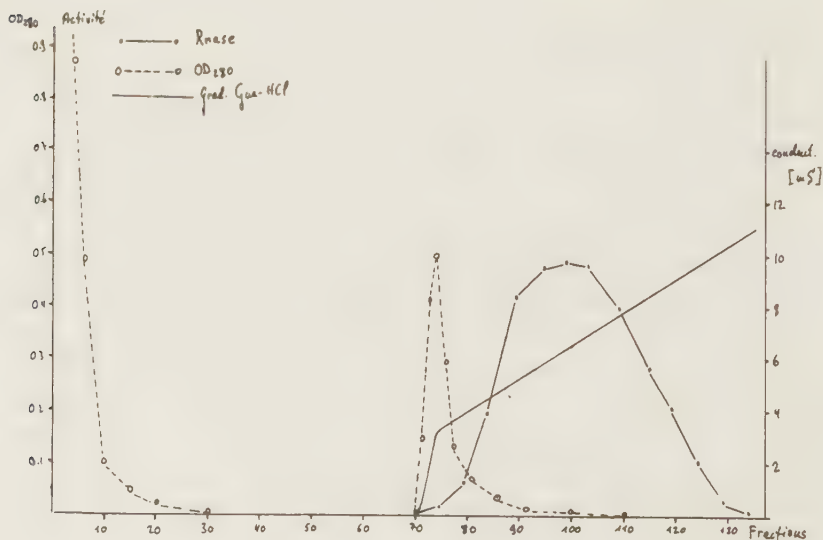
### f 2) Chromatographie sur Sephadex G-200

La fraction contenant la Rnase II (avec la Pase) obtenue comme décrit sous e) est dialysée contre du tampon acétate de sodium pH = 4,5, 10 mM puis concentrée par fixation sur une colonne de cellulose DE-52 (1/5 cm., équilibrée dans le même tampon) et élution rapide par 50 ml. de NaCl 1M. La Rnase II est alors séparée de la Pase par chromatographie sur une colonne de Sephadex G-200 (2,5/100 cm., équilibrée dans un tampon Tris-HCl pH = 7,5, 20mM débit : 10 ml/h.) de la solution concentrée.



## g 2) Chromatographie d'affinité.

Les fractions contenant la Rnase II sont réunies (480ml.), acidifiées à pH = 4,0 par de l'acide acétique et chromatographiées sur la même résine d'affinité que la Rnase I, mais avec un tampon d'équilibration à pH = 4,0 (acétate 20 mM) et un gradient de guanidine-HCl de 0,05 à 0,2 M. Les fractions contenant la Rnase II (125 ml.) sont réunies, dialysées, concentrées et conservées comme décrit pour la Rnase I.



### 3. Résultats, discussion.

La Rnase I de *Physarum polycephalum* a été purifiée environ 2000 fois, la Rnase II environ 1000 fois. Le tableau I donne un résumé des différentes étapes de purification avec leurs rendements respectifs relativement à la solution de départ. Lors des premières étapes, où les deux RNases ne sont pas encore séparées, les tests d'activités ont été fait à pH = 4,5. L'activité spécifique est donnée en Unités par mg. de protéines, où le nombre de mg. de protéines est mesuré selon la méthode de Lowry (53), avec la BSA comme référence d'étalonnage.

TABLEAU I

| Etape | Opération                         | volume<br>(ml) | prot. tot. (g) | act. tot. (U) | rend.act. % | spé. |
|-------|-----------------------------------|----------------|----------------|---------------|-------------|------|
| a)    | milieu brut dilué                 | 20 000         | 38,5           | 55000         | 100         | 1,43 |
| b)    | adsorption DE-11                  | 1 800          | 2,77           | 38307         | 70          | 13,8 |
| c)    | concentration                     | 423            | 1,69           | 29497         | 54          | 19,1 |
| d)    | chromato. sur Sephadex G 25       | 2 750          | 1,2            | 30062         | 55          | 25,0 |
| e)    | chromato. DE-52                   |                |                |               |             |      |
|       | Rnase II                          | 405            | 0,4            | 3266          | 6           | 8,2  |
|       | Rnase I                           | 470            | 0,28           | 23888         | 43          | 84,1 |
| f 1)  | Rnase I chromato. SP-Sephadex     | 310            | 28,3mg         | 19110         | 35          | 675  |
| g 1)  | Rnase I chromato. d'affinité      | 145            | 6,8mg          | 16244         | 30          | 2400 |
| f 2)  | Rnase II chromato. sephadex G 200 | 480            | 262mg          | 2939          | 5           | 11,2 |
| g 2)  | Rnase II chromato. d'affinité     | 125            | 2,7mg          | 2498          | 4,5         | 903  |

La méthode de purification employée repose sur les propriétés ioniques et biochimiques des RNases de *P. polycephalum*. Leur point isoélectrique très bas (voir chapitre suivant) permet d'utiliser un échangeur d'anions tel que la DEAE-cellulose à un pH assez bas où d'autres protéines, moins acides, portent déjà une charge nette positive. La purification par chromatographie d'affinité, mise au point par Mme Niemeyer pour les RNases de *P. polycephalum* d'après Cuatrecasas (29), meilleure du point de vue théorique, n'est cependant réalisable qu'au terme de la purification, car le milieu de culture doit être préalablement débarrassé de substances diverses engluant irrémédiablement les supports de chromatographie.

Les principales difficultés rencontrées lors de la purification proviennent de la nature du milieu de culture où s'est développé le *Physarum*. Ce milieu, très visqueux, contient, outre des substances nutritives (hématine et peptones), des résidus du métabolisme de *P. polycephalum* dont la nature n'a pas été entièrement déterminée à l'heure actuelle et en particulier le mucilage de *Physarum*, composé presque entièrement de  $\beta$ -galactanes ramifiés de haut poids moléculaire, fortement substitué par des groupes phosphates et sulfates (28). De nombreux essais ont montré que l'élimination de ces substances par chromatographie sur gel ou sur échangeur d'ion était très difficile, en raison entre autre du très large spectre de poids moléculaire couvert par ces produits et de leur forte densité de charges négatives. D'autre part, la quantité de RNase I + II au départ est faible : environ 1 mg. par litre de milieu brut (soit 1 mg. pour 20 gr. de matière sèche). Enfin, la recherche simultanée dans le milieu de culture de *P. polycephalum* d'une phosphatase acide (26) nous a obligés à prendre des précautions que l'extraction des seules ribonucléases ne demandait pas.

Les différentes étapes et méthodes décrites ci-dessus appellent quelques commentaires. La purification du RNA commercial

sur Sephadex G 25 vise à éliminer les résidus nucléotidiques de bas poids moléculaire, solubles en milieu acide et engendrant là un "blanc" trop important dans le test d'activité Rnase d'Anfinsen. Ce test a été utilisé à cause de sa simplicité et de sa rapidité. C'est d'autre part l'un des plus employés, sous de nombreuses variantes, par les auteurs ayant isolé et purifié d'autres RNases nouvelles. Il en existe d'autres, basés sur la modification d'absorbance dans l'UV du RNA ( 8 ) ou d'un nucléotide cyclique 2', 3' phosphate lorsqu'ils sont hydrolysés. La vitesse d'hydrolyse d'un nucléotide 2', 3' phosphate est d'ailleurs utilisée comme norme pour les RNases vendues dans le commerce.

La dilution préalable du milieu de culture (étape a) est indispensable à cause de la viscosité de la solution. Sans cette dilution, la cellulose est impossible à séparer par décantation et la force ionique du milieu trop importante pour permettre aux enzymes d'être adsorbés en quantité appréciable.

Les étapes c) et d), concentration puis dessalage sur G 25, superflues à première vue, permettent en fait d'obtenir une solution suffisamment fluide pour que la chromatographie sur cellulose DE-52 soit possible. D'autre part, le dessalage sur Sephadex G 25 donne aussi lieu à l'élimination de nombreux contaminants de faible poids moléculaire. Un milieu moins visqueux au départ permettrait de sauter ces deux étapes.

Pour purifier à un haut degré la Rnase I, la chromatographie d'affinité peut être remplacée par une alternance de chromatographies sur échangeurs d'anion et de cation (cellulose DE-52 et SP-Sephadex). L'activité spécifique atteint le même niveau et c'est une préparation dérivant de ce procédé qui a été employée pour toutes les mesures de spécificité et de cinétique de la Rnase I. Cependant, la chromatographie d'affinité, outre l'élégance de la méthode, est deux ou trois fois plus rentable. J'ai obtenu dans les études de spécificité des résultats identiques avec la RNase I préparée selon ces deux voies différentes, montrant par là que la concentration

en chlorhydrate de guanidine nécessaire pour désorber la Rnase de la colonne d'affinité n'avait pas d'effet irréversible sur l'activité de l'enzyme, une fois celui-ci débarrassé du chlorhydrate de guanidine.

La faible quantité d'enzyme obtenue en fin de purification limite l'emploi des tests habituels de pureté, tels les électrophorèses sur gel de polyacrylamide. En effet, nos Rnases sont difficiles à colorer soit avec le bleu de Coomassie soit avec l'amidoschwarz . Les seuls critères de pureté que j'aie pu montrer sont la symétrie et l'homogénéité des pics de chromatographie au terme de la purification et l'expérience suivante : deux solutions de Rnase purifiée sont soumises à une électrophorèse sur deux gels de polyacrylamide (54) dont l'un est coloré à l'amidoschwarz ou au bleu de coomassie et l'autre découpé en tranches de 1 mm., incubées ensuite chacune une nuit en chambre froide avec 1 ml. de tampon acétate de Na 10 mM pH = 4,5 pour la Rnase I ou citrate de Na 10 mM pH = 3,1 pour la Rnase II. Un test d'activité est opéré en prélevant 0.5 ml. des solutions contenant les tranches de gel. Cette expérience a montré, d'une part, l'absence de protéines contaminantes décelables par coloration dans le premier gel, et d'autre part, un seul pic fin d'activité Rnase dans le second.

### III. QUELQUES PROPRIETES DES RNASES DE *P. POLYCEPHALUM*.

Ce chapitre groupe tous les résultats d'expériences faites en vue de définir les propriétés les plus directement accessibles des deux ribonucléases de *Physarum polycephalum*, à l'exception de leur spécificité, qui fait l'objet du chapitre suivant.

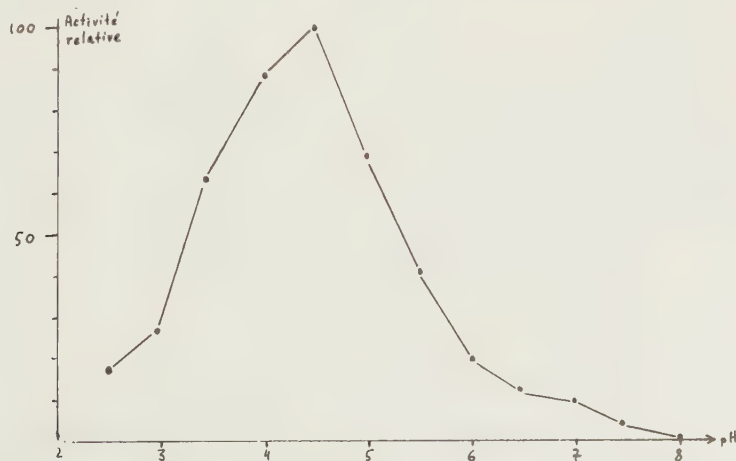
#### 1. pH optimum.

##### Méthode :

Des tampons contenant 2 mg/ml. de RNA de levure purifié sont préparés avec des solutions d'acide citrique 0,1 M et de  $K_2HPO_4$  0,2 M mélangées de façon à obtenir une gamme de pH allant de 2 à 8. Ces solutions de tampon contenant le RNA sont ensuite employées pour faire le test d'activité comme déjà décrit, avec une solution de RNase dialysée pendant une nuit contre de l'eau distillée.

##### Résultat :

La figure ci-dessous, illustrant l'activité de la RNase I en fonction du pH, permet de situer le pH optimum à 4,5.



De la même façon le pH optimum de la Rnase II a été trouvé égal à 3,1.

## 2. Facteurs affectant l'activité.

### Méthode :

Nous avons mesuré le pouvoir inhibiteur ou activateur de certains réactifs employés systématiquement par Egami ( 6 ), afin de comparer sur ce point nos deux Rnases à d'autre ribonucléases de microorganismes. Le test d'activité est fait comme déjà décrit, mais en présence A) de divers inhibiteurs potentiels à une concentration de 2 mM et B) de NaCl ou de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en concentration variable. Le test fait sans adjonction de réactif sert de norme (100%).

### Résultat :

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau II.

TABLEAU II

|    | réactif                    | act.Rnase I | Rnase II |
|----|----------------------------|-------------|----------|
|    | rien                       | 100 %       | 100 %    |
| A) | HgCl <sub>2</sub>          | 13          | 15       |
|    | Cu SO <sub>4</sub>         | 110         | 54       |
|    | EDTA                       | 95          | 90       |
|    | p-hydroxy-mercuri-benzoate | 102         | -        |
|    | ICH <sub>2</sub> COOH      | 89          | 100      |
| B) | NaCl 2.10 <sup>-3</sup> M  | 108         |          |
|    | 2.10 <sup>-2</sup> M       | 85          |          |
|    | 2.10 <sup>-1</sup> M       | 75          |          |
|    | 0,5 M                      | 51          |          |
|    | 1,0 M                      | 45          |          |
|    | 2,0 M                      | 31          |          |

TABLEAU II (suite)

| réactif                                                 | act.Rnase I |
|---------------------------------------------------------|-------------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,125 M | 62 %        |
| 0,25 M                                                  | 58          |
| 0,5 M                                                   | 48          |
| 1,0 M                                                   | 0           |

Remarque : des expériences de précipitation au sulfate d'ammonium ont montré que le début de la précipitation se situe vers 40 % de saturation (1,8 M) et qu'il faut 80 % de saturation (480 gr/lit. soit environ 3,6 M) pour précipiter quantitativement (à 92 %) la RNase I.

### 3. Influence de la température sur l'activité.

#### Méthode :

Deux séries de mesures ont été effectuées : l'une en variant la température d'incubation d'un test standard, l'autre en soumettant la RNase dissoute dans un tampon (acétate 10 mM pH = 4,5 pour Rnase I et citrate pH = 3,1 pour Rnase II) à une préincubation de 20 min, pour une température donnée et en utilisant ensuite immédiatement cette solution pour un test standard à 40°C pendant 20 min.

#### Résultats :

Le tableau IIIa donne les résultats de la première série de mesures (activité en fonction de la température d'incubation) et le tableau IIIb ceux de la deuxième série (résistance à une incubation de 20 min. à une température donnée). Les figures ci-dessous illustrent ces données et montrent un maximum d'activité entre 40 et 50°C et une résistance à la température diminuant assez fortement au delà de 40°C.

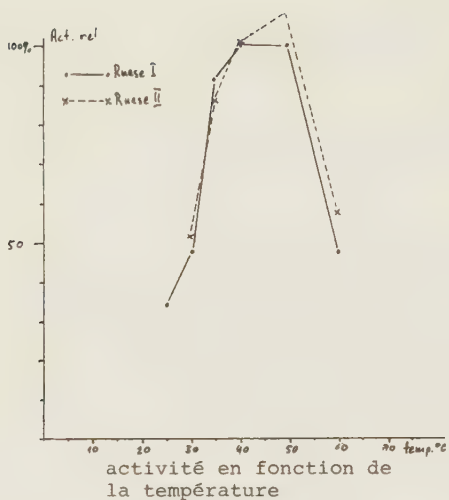


TABLEAU IIIa

| act.mesurée à | Rnase I | Rnase II |
|---------------|---------|----------|
| 25°C          | 34%     | 63%      |
| 30            | 48      | 51       |
| 35            | 91      | 86       |
| 40            | 100     | 100      |
| 50            | 100     | 120      |
| 60            | 48      | 57       |

TABLEAU IIIb

| préincubation à<br>pendant 20 min. | act.residuelle<br>Rnase I | Rnase II |
|------------------------------------|---------------------------|----------|
| 20°C                               | 100%                      | 100%     |
| 30                                 | 125                       | 91       |
| 40                                 | 94                        | 77       |
| 50                                 | 58                        | 81       |
| 55                                 | 55                        | 60       |
| 60                                 | 67                        | 77       |
| 65                                 | 50                        | 79       |
| 75                                 | 22                        | 25       |

#### 4. Poids moléculaire

##### a) Gel-Sieving

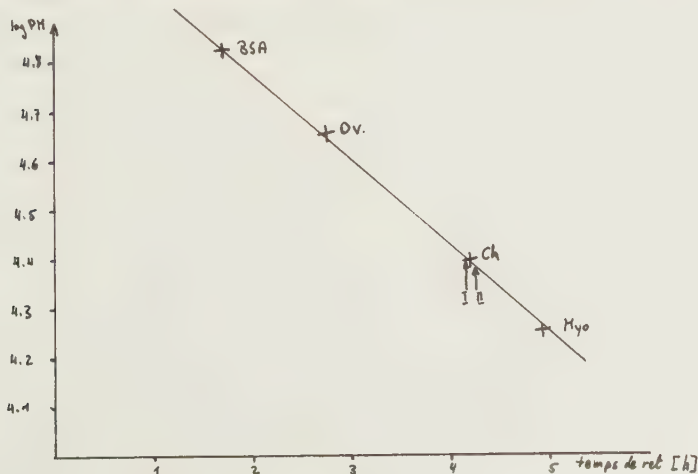
##### Méthode :

La détermination du poids moléculaire a été faite par chromatographie sur une colonne de Sephadex G-100 de 1/100cm équilibrée dans du tampon Tris-HCl pH = 7,5, 10 mM. Le débit était de 4 ml/h., stabilisé par une pompe peristaltique. L'absorbance de l'effluent a été mesurée en continu à 280 nm avec un moniteur LKB Uvicord. Chaque échantillon (2 mg. de protéine de référence dans 0,5 ml de tampon d'équilibrage ou 0,5 ml. de solution de ribonucléase ajoutés à 0,5 ml. de solution de "Blue dextran 2000") a été chromatographié l'un après l'autre. Des fractions de 1 ml. ont été collectées pour détecter les ribonucléases par des tests d'activité.

Les protéines de référence proviennent de Sigma, Heidelberg (Myoglobine, Chymotrypsinogène, BSA, Ovalbumine), le Blue Dextran 2000 et le Sephadex de Pharmacia.

##### Résultat :

Dans des opérations séparées, le temps de rétention de 4 protéines d'étalonnage a été mesuré par référence au "Blue Dextran", de même que celui des deux RNases de *P. polyccephalum*. Le logarithme du poids moléculaire a été reporté sur un graphique en fonction du temps relatif de rétention (30) :



Les RNases de *P. polycephalum* se situent sur ce graphique à un poids moléculaire de 25 500 pour la RNase Phy I et de 24 500 pour la RNase Phy II.

b) Electrophorèse en présence de SDS et de mercaptoethanol.

Nous avons utilisé sans modification la méthode de Weber et Osborne (55) et celle de dansylation préalable de Talbot & al. (2). Nous n'avons jamais obtenu de résultats entièrement satisfaisants, probablement à cause de la trop faible concentration de nos échantillons de RNase, et de la difficulté qu'il y a à colorer ces enzymes.

5. Point isoélectrique.

Méthodes :

Nous avons employé deux méthodes de détermination du point isoélectrique. Toutes les deux se fondent sur le principe de la focalisation des protéines dans un gradient de pH et dans un champ électrique, mais elles varient quant au support utilisé.

La première, décrite par Conways-Jacob & al. (3) utilise un gel d'acrylamide, alors que la seconde (4) emploie un support liquide et du saccharose pour stabiliser le gradient de pH. Nous avons utilisé dans ce dernier cas une colonne LKB de 110ml. et des ampholines LKB 3-5. Je ne décrirai que la première des méthodes citées, la seconde étant très connue.

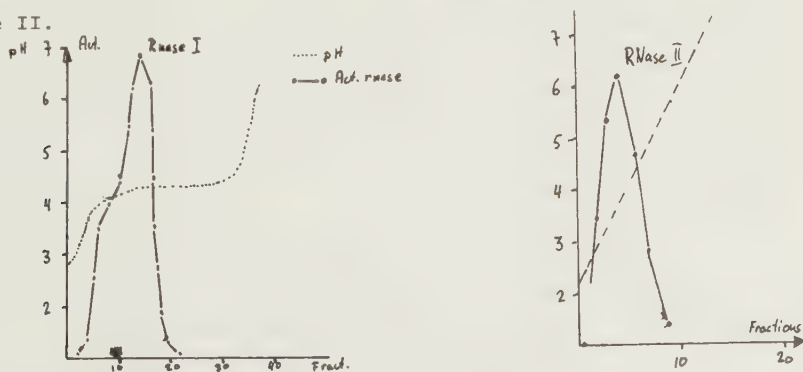
On prépare une solution d'acrylamide contenant 0,8 gr. de N',N'-méthylènebisacrylamide, 30 gr. d'acrylamide et de l'eau jusqu'à un volume de 100 ml. et une solution de catalyseur de polymérisation contenant 1 ml. de N,N,N',N'-tetraméthyléthylène-diamine, 14 mg. de riboflavine et de l'eau jusqu'à un volume de 100 ml. Les gels sont préparés en mélangeant 1,2 ml. de la solution de catalyseur, 4,5 ml. de la solution d'acrylamide, 0,9 ml.

d'ampholines LKB, pH 3 - 10. 0,8 ml. de cette solution sont versés dans chacun des tubes de verre (6/85 mm.) servant de support à l'électrophorèse et 1,4 ml. de solution d'enzyme ou de protéine dont on cherche le point isoélectrique y sont ajoutés. Le tout est agité et photopolymérisé à l'aide d'une lampe à fluorescence. La concentration des gels est de 0,4 % (volume/volume) et de 7,7 % (poids/vol.) en acrylamide.

Les tubes contenant le gel sont alors placés entre un compartiment cathodique inférieur plein de triéthanolamine à 0,4 % (vol/vol), pH = 10,9 et une chambre anodique supérieure contenant de l'acide sulfurique à 0,4 %. Une tension de 300 V est appliquée entre les deux électrodes. L'équilibre isoélectrique est atteint en 2 h. environ, après quoi les gels sont sortis des tubes et débités en tranches de 1 mm. Chaque tranche est équilibrée pendant 30 min. dans 1 ml. d'eau bidistillée décarbonatée, et le pH de la solution résultante est mesuré à la température ambiante (20°C). La Rnase est ensuite localisée par dosage de l'activité dans des échantillons de 0,5 ml. prélevés dans chaque tube.

### Résultats :

Les figures ci-dessous, illustrant le résultat obtenu par la méthode du "gel-electrofocussing" donnent le pH et l'activité mesurée dans chaque tranche de gel. On peut situer le point isoélectrique à 4,3 pour la Rnase I et à 3,8 pour la Rnase II.



Des valeurs identiques ont été trouvées avec l'autre

méthode.

## 6. Discussion.

Le tableau IV donne un résumé des propriétés des RNases I et II de *P. polycephalum* examinées dans ce chapitre ainsi qu' un rappel de celles d'autres RNases connues (5,50) à fin de comparaison.

TABLEAU IV

| enzyme               | pH optimum<br>substrat : RNA | pI  | PM     |
|----------------------|------------------------------|-----|--------|
| RNase Phy I          | 4,5                          | 4,3 | 25 500 |
| RNase Phy II         | 3,1                          | 3,8 | 24 500 |
| RNase T <sub>1</sub> | 7,4                          | 2,9 | 11 000 |
| RNase T <sub>2</sub> | 4,5                          | 5   | 36 200 |
| RNase U <sub>2</sub> | 4,5                          | -   | 10 000 |
| RNase pancreas bovin | 7,7                          | 9,6 | 13 600 |

Les deux RNases de *P. polycephalum* présentent certaines ressemblances importantes <sup>avec</sup> les RNases microbiennes et fongiques : le point isoélectrique acide, l'insensibilité à l'EDTA démontrant l'absence de cation dans le mécanisme catalytique de l'enzyme, l'absence de groupes -SH au site catalytique révélée par l'absence de réaction à l'égard des réactifs spécifiques de ce groupement. L'inhibition par Hg<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup>, s'explique probablement plutôt par une complexation des bases nucléiques (les constantes de dissociation -de l'ordre de 10<sup>-15</sup> pour Hg<sup>2+</sup>- sont en effet particulièrement petites) par ces métaux que par une action sur le mécanisme catalytique de la RNase lui-même. De même, on peut penser que la force ionique a un effet non seulement sur la structure de l'enzyme, mais encore plus sur celle du substrat.

La courbe donnant l'activité en fonction du pH suggère des pK de groupes au site catalytique aux alentours de 3,5 et 5,5 très approximativement. Il faut rappeler à ce sujet le pK des 2 histidines (12 et 119) du centre actif de la RNase pancréatique (5,4 et 6,4) et les 3 pK (3,5 - 5,7 - 7,5) de groupes dissociables appartenant au centre actif de la RNase T<sub>1</sub>, dont les

deux premiers ont été attribués respectivement au groupement carboxyle de l'acide glutamique 58 et à l'histidine 92. Pour les RNases de *p. polycephalum*, il est plausible d'émettre l'hypothèse de la participation d'un groupe carboxyle au site actif de l'enzyme.

Le poids moléculaire des RNases de *P. polycephalum*, par contre, semble placer ces deux enzymes dans une classe intermédiaire, car les RNases microbiennes et fongiques ont soit un poids moléculaire plus bas (10 000 - 15 000) pour la plupart des RNases spécifiques, soit un poids moléculaire plus haut (env. 40 000). Cependant, la détermination du poids moléculaire donnée dans ce travail ne repose que sur des expériences de "gel-sieving", sujettes à des erreurs systématiques dues au coefficient de friction non compensé et à des interactions possible entre la protéine et le gel. Le poids moléculaire assigné aux deux RNases décrites ici doit donc être considéré avec une certaine prudence. Pour donner un résultat plus fiable, il faudrait posséder une solution de RNase suffisamment concentrée pour avoir une absorbance dans l'UV assez élevée, afin de permettre l'usage de la sédimentation à l'équilibre pour déterminer la masse moléculaire. Cette dernière méthode n'est en effet pas sujette aux mêmes erreurs que celle que j'ai utilisée.

La différence de point isoélectrique entre la Rnase I et la Rnase II permet de séparer facilement ces deux enzymes sur résine échangeuse d'ions. A pH = 3,5, la Rnase I est totalement fixée sur SP-Sephadex, alors que la Rnase II n'y est pratiquement pas retenue. Cette étape de la purification permet donc de garantir la non-contamination d'une préparation de l'une des RNases par l'autre, condition préalable indispensable à l'étude de la spécificité.

## IV. SPECIFICITE DES RNASES PHY I ET PHY II.

### A. INTRODUCTION.

#### 1. Principe des analyses.

A part l'étude du mécanisme moléculaire de la spécificité et de l'action catalytique des ribonucléases, l'intérêt de la mise en évidence d'une nouvelle ribonucléase est la connaissance de sa spécificité propre envers l'un ou l'autre des nucléotides, afin d'ajouter éventuellement un outil nouveau pour les études de séquence du RNA. J'ai déterminé la spécificité des deux ribonucléases exocellulaires de *Physarum polycephalum* par deux voies différentes : I) par l'étude de la vitesse de dégradation de tous les dinucléosides monophosphates par les RNases Phy I et Phy II dans des conditions comparables, et II) par l'analyse des mononucléotides et des extrémités d'oligonucléotides engendrés par l'activité des RNases de *P. polycephalum* sur le RNA.

I) La vitesse de dégradation des dinucléosides monophosphates est mesurée par dosage des différents produits de la réaction après un temps donné d'incubation avec la RNase. Ces produits sont théoriquement au nombre de quatre :



le substrat non transformé (dinucléoside monophosphate : NpY), le nucléoside libéré lors de la première étape de réaction (Y) (transfert du phosphate), le nucléoside 2':3' phosphate cyclique produit au cours de cette même étape (N > p) et enfin le nucléoside 3' phosphate (Np) résultant de la solvolysse proprement dite, deuxième phase de la réaction. Ces produits sont facilement séparables sur un échangeur d'anions et dosables au spectrophotomètre.

II) L'analyse des fragments de RNA produits par l'action de la RNase est en partie décrite par Torti et al. (11). Le principe en est le suivant : Une solution de RNA est incubée en présence de RNase pendant un temps donné. La réaction est alors bloquée, dans notre cas par élévation du pH, pour inhiber l'activité

de la RNase, puis la solution, appelée solution de départ, est soumise aux traitements décrits ci-dessous. (Voir tableau V).

1) Les mononucléotides libérés par l'action de la RNase sont isolés directement par chromatographie sur un échangeur d'ion d'une aliquote de la solution de départ, dans des conditions telles que: a) les quatre nucléosides 2':3' phosphates cycliques et les quatre nucléosides 3' phosphates non cycliques soient tous séparés les uns des autres, et b), les oligonucléotides restants soient tous séparés des mononucléotides cycliques ou non.

2) Une autre aliquote de la solution de départ est soumise à l'action de la phosphodiesterase de venin de serpent (32,21). Cet enzyme agit sur les oligonucléotides comme une exonucléase qui hydrolyse les liaisons 3'O-P et libère ainsi trois types de produits selon la place qu'ils occupaient dans la séquence. Les nucléotides situés au milieu d'un segment de chaîne apparaissent sous la forme de nucléosides 5' phosphates (pN), les nucléotides 3' terminaux sous la forme de nucléoside 5', 3' diphosphates ou de nucléosides 5'-phosphates, 2':3' phosphates cycliques (pNp ou  $pN > p$ ), selon que la RNase a catalysé une seule ou les deux étapes de la réaction (transfert du phosphate et hydrolyse). Les nucléotides 5' terminaux, qui ne possèdent pas de phosphate en 5', puisque les fragments dont ils sont l'extrémité proviennent de l'action de la RNase sur le RNA, se retrouvent sous forme de nucléosides. Ces nucléosides 5' terminaux sont alors isolés, après élimination de tous les nucléotides par passage de la solution sur un échangeur d'anions.

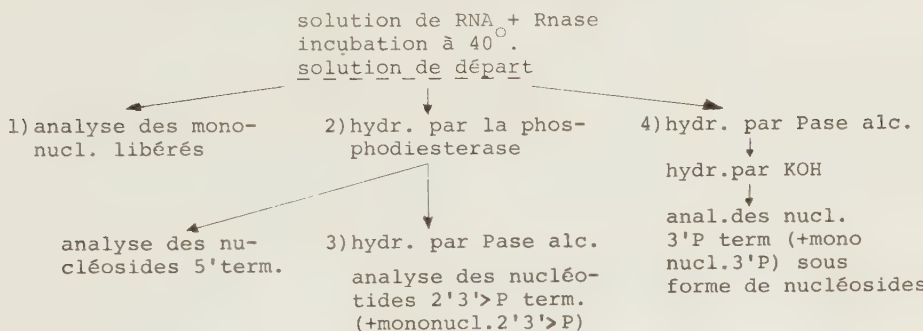
3) Une partie du mélange de nucléosides et de nucléotides, obtenu à partir des fragments de RNA dans la solution de départ par hydrolyse enzymatique à la phosphodiesterase, est ensuite incubée avec de la phosphatase alcaline de E. coli (22,33). Cet enzyme catalyse la scission de toutes les liaisons monoester-phosphate P-O5' avec libération de nucléoside et de phosphate inorganique, mais laisse intacte les liaisons nucléosides-phosphate des nucléotides 2':3' cycliques. Tout le RNA de la solution de départ se trouve donc à l'état de nucléosides, sauf les extrémités 2':3' cycliques phosphates qui apparaissent sous la forme de mononucléotides 2':3' cycliques.

Une analyse de ces nucléotides donne la composition des extrémités 3' des oligonucléotides dérivés de l'action incomplète (1ère étape : transfert du phosphate) de la RNase sur le RNA. Il faut toutefois remarquer ici que les mononucléotides 2':3' cycliques libérés tels quels par la RNase sont aussi présents dans la solution, puisqu'il ne sont altérés ni par le traitement à la phosphodiesterase ni par la phosphatase. Il faut donc en tenir compte dans l'inventaire final (en soustrayant les mononucléotides 2':3' cycliques trouvés lors de l'analyse décrite au point 1) ci-dessus).

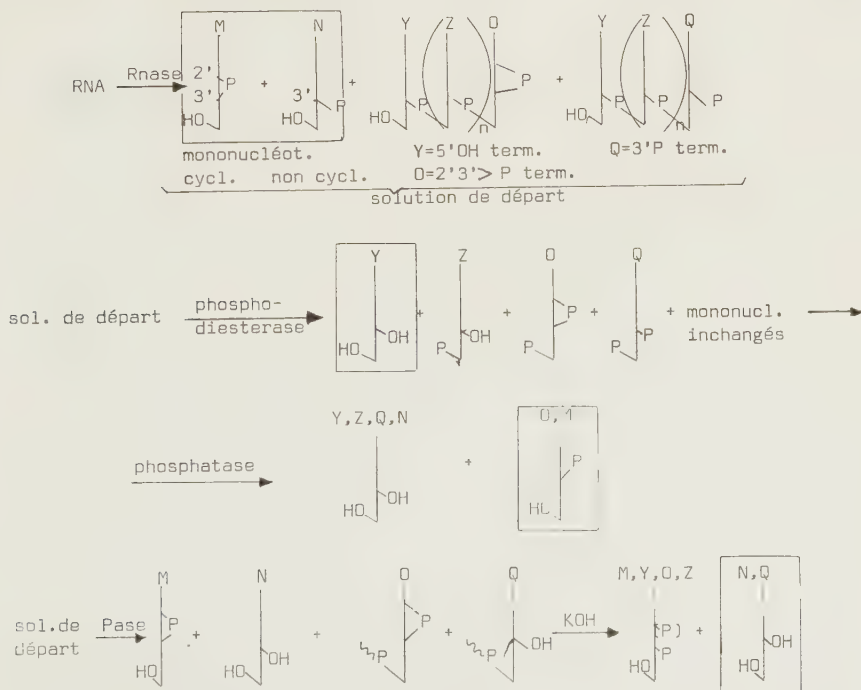
4) Dans le cas où la RNase catalyse non seulement le transfert du phosphate, mais aussi l'hydrolyse de l'intermédiaire 2':3' cyclique, les extrémités 3' des fragments de RNA (et les mononucléotides) apparaîtront sous la forme de 3'phosphates non cycliques. Pour analyser ces extrémités 3' non cycliques, une partie de la solution de départ est soumise directement à l'action de la phosphatase alcaline, suivie par une hydrolyse alcaline non enzymatique. Tout le RNA est alors transformé en nucléotides, sauf les extrémités 3' (et les mononucléosides 3' phosphates libérés sous cette forme par la RNase) qui sont sous la forme de nucléosides, et par-là, faciles à distinguer et à analyser. La même remarque qu'au point 3) peut être faite à propos des 3'-mononucléotides libérés tels quels par la RNase.

Le tableau V résume ce qui vient d'être dit.

TABLEAU V  
analyse des extrémités du RNA digéré.



Ce qui s'exprime chimiquement par :



## 2. Chromatographie en phase liquide et sous haute pression.

La séparation des nucléosides et des nucléotides est présentée dans ce travail sous deux aspects très différents : la chromatographie traditionnelle sur Sephadex et la chromatographie en phase liquide et sous haute pression (abrégée en HPLC). Des raisons matérielles uniquement ne m'ont pas permis d'utiliser seulement la seconde, infiniment supérieure à tous points de vue. La technique HPLC, connue et utilisée depuis longtemps à des pressions de 10 à 20 atm. (analyse automatique des acides aminés par exemple) a connu un essor important lorsque l'on a pu trouver sur le marché des supports de chromatographie résistants et qui permettent un très grand débit sous haute pression. En effet, ces supports, composés en général de billes de verre recouvertes d'une couche très mince d'un adsorbant sont pratiquement incompressibles et résistent à des pressions allant jusqu'à 300 atmosphères. A de telles pressions, la vitesse d'élution et la résolution sont telles que cette chromatographie liquide-solide se place sur pied d'égalité avec la chromatographie en phase gazeuse, tout en permettant d'analyser directement une phase aqueuse sans avoir besoin de rendre volatils les produits à analyser. Ce dernier avantage peut être décisif dans l'analyse des métabolites dont la "dérivatisation" est souvent délicate. Pour que la HPLC reste un procédé plus favorable, il faut pouvoir détecter les produits analysés de manière efficace. Les produits possédant des chromophores dans le visible ou dans l'ultra-violet, telles les purines et les pyrimidines, ne posent pas de problème à cet égard, car ils peuvent être détectés par passage de l'effluent dans un spectrophotomètre à flux continu dont la sensibilité permette de doser linéairement des quantités de nucléotides ou de nucléosides entre 0,05 et 10 nanomoles. Il existe maintenant pour les produits sans chromophores (sucres par exemples), des réactants analogues à ceux qu'on emploie pour les acides aminés, où une réaction colorimétrique permet de détecter et de doser les produits élués de la colonne de chromatographie.

L'utilisation de colonnes de Partisil-10 SAX pour la séparation des nucléotides a été décrite par Hartwik et Brown. La séparation se fait par échange d'ions, sans recours à un gradient de concentration en sel.(31)

Comme j'ai utilisé la chromatographie traditionnelle pour déterminer la spécificité de la Rnase I et la HPLC pour déterminer la spécificité de la Rnase II, je sépare dans l'exposé l'étude de ces deux enzymes, avec pour chacun d'eux la description de la méthode employée, des résultats obtenus et de la spécificité déduite de ces résultats. Une discussion générale, rappelant entre autre les résultats obtenus avec les Rnases de *P.polycephalum* par d'autres laboratoires, clôt ce chapitre.

## B. SPECIFICITE DE LA RNASE I.

### 1. Matériel, méthodes.

Les Sephadex G-10 et QAE-A-25 proviennent de Pharmacia (Suède). Le collecteur de fractions avec moniteur UV (Uvicord) de LKB. Les mesures d'absorbance ont été faites avec un spectrophotomètre Varian 101 et les spectres d'identification avec un spectrophotomètre Perkin Elmer 402. Les dinucléosides monophosphates les nucléotides cycliques ou non et les nucléosides proviennent de Sigma ou de Miles. Le RNA de levure de Fluka (purifié comme déjà décrit) ou de Serva (RNA de haut poids moléculaire  $Sv_{20} = 8$ ). Les enzymes (phosphatase alcaline de *E.Coli* en suspension dans du sulfate d'ammonium et phosphodiesterase de venin de *Crotalus Adamantus*), de qualité analytique, proviennent de Worthington

#### a) Hydrolyse des dinucléosides monophosphates.

0,1 ml. de Rnase I à 7 U/ml en solution dans du glycérol à 40 % dans du tampon acétate de sodium 0,01 M pH = 4,5 sont ajoutés à 1 mg. de dinucléoside monophosphate dans 0,5 ml. de tam-

pon acétate de sodium 0,01 M pH = 4,5. La concentration en dinucléoside monophosphate est d'environ 3 mM. Le mélange est incubé à 40°C pendant un temps variant de 5 minutes à 15 heures selon l'expérience considérée. L'hydrolyse est arrêtée par adjonction de 0,06 ml. de tampon Tris/HCl 0,1 M pH = 8,6.

Le milieu réactionnel ainsi obtenu est placé sur une colonne de QAE-Sephadex A-25 (1/60 cm, équilibrée dans un tampon Tris/HCl 1 mM pH = 7,5) et élué par un gradient de NaCl (0 - 0,5M dans le tampon d'équilibration, débit : 25 ml/h., fractions de 4,5 ml., volume total : 800 ml.). L'absorbance à 260 nm est mesurée, ce qui permet le dosage des différents produits de la réaction dont l'identification est faite d'après le spectre UV entre 220 et 300 nm : la fraction qui se trouve au maximum d'absorption à 260 nm est prélevée et son spectre UV enregistré en milieu acide (HCl 0,1 N) et basique (NaOH 0,1N) aux fins de comparaison avec les spectres des témoins dans les mêmes conditions(34). Le produit de réaction ainsi identifié est alors dosé, connaissant son absorbance spécifique à 260 nm et à pH neutre (34), par intégration du pic d'absorbance à 260 correspondant du chromatogramme.

#### b) Digestion du RNA par la Rnase I.

La nature des mononucléotides et celle des nucléosides 5' terminaux et des nucléotides 3' terminaux des oligonucléotides libérés par l'action de la Rnase I de *P.polycephalum* sur le RNA a été déterminée selon la méthode de Torti & al.(11), avec quelques modifications:

12 mg. de RNA de levure sont dissous dans 5 ml. de tampon acétate d'ammonium 50 mM pH = 4,5. Une solution de Rnase I est ajoutée (même solution que ci-dessus) à la solution de RNA en quantité variant selon le rapport enzyme/substrat désiré, puis le volume du mélange réactionnel est amené à 7 ml. avec le tampon acétate d'ammonium. Ce mélange est incubé à 40°C pendant 15 min. à 24 h selon l'expérience.

Après l'incubation, le pH de la solution est porté à 8,0 par  $\text{NH}_4\text{OH}$  1M (pH auquel la RNase I n'a plus d'activité). La solution ainsi obtenue est appelée ci-après "solution de départ".

Un volume de 2 ml. de la solution de départ est placé sur une colonne de QAE-Sephadex A-25 (1/60 cm., équilibrée dans du tampon Tris/HCl 1 mM pH = 7,5) et les mononucléotides sont élués par un gradient de concentration de NaCl (0 - 0,2 M dans le tampon d'équilibration, débit : 46 ml/h., volume total 800 ml., fractions de 4,5 ml.). Dans ces conditions, la fraction oligonucléotidique demeure fixée à l'échangeur d'ions. L'absorbance des fractions est mesurée à 260 nm, ce qui permet de mesurer la quantité de chaque mononucléotide libéré.

Une quantité de 0,5 mg de diesterase de venin de serpent est ajoutée au reste de la solution de départ. Ce mélange est incubé pendant 15 heures à 40°C. Un volume de 2 ml de cet hydrolysate est prélevé et passé sur une petite colonne de Sephadex QAE A-25 (1/5cm, équilibrée dans Tris/HCl 1 mM pH =7,5). Les nucléosides 5'OH terminaux, non retenus, sont recueillis et concentrés au rotavapor (évaporation sous vide partiel : 10 mm.Hg) puis chromatographiés sur une colonne de Sephadex G-10 (35) (1/200 cm, équilibrée dans le tampon Tris/HCl pH = 7,5, débit 15 ml/h., fractions de 3 ml.). Le RNA restant, sous forme de nucléotides, est éliminé par la petite colonne de QAE-Sephadex. Après la chromatographie des nucléosides sur Sephadex G-10, l'adénosine et la guanosine sont dosés comme déjà décrit par mesure de l'absorbance des fractions à 260 nm, alors que les fractions contenant l'uridine et la cytidine, mal séparées, sont réunies, acidifiées par HCl et passées sur une petite colonne de SP-Sephadex C-25 (1/5 cm, équilibrée dans de l'acide citrique 0,01 M). Après passage de l'uridine, non retenue, la cytidine est élue par NaCl 1 M. Ces deux nucléosides peuvent alors être dosés séparément.

10  $\mu$ l. (8 U) de suspension de phosphatase alcaline de E.Coli sont ajoutés au reste de l'hydrolysate obtenu par l'action de la phosphodiesterase sur la solution de départ. Ce nouveau mé-

lange est incubé 15 heures à 40°C, puis 2 ml. en sont prélevés et chromatographiés sur QAE-Sephadex A-25 dans les mêmes conditions que pour l'analyse des mononucléotides. Les nucléosides 2'3' cyclique phosphate terminaux (avec les mononucléosides 2'3' cyclique phosphate préexistants) sont élués après le reste du RNA, non retenu sur la colonne puisqu'il est sous forme de nucléosides.

L'analyse d'éventuels mononucléotides 3'phosphates et d'extrémités 3' phosphates non cycliques n'a pas été faite, car la Rnase I n'hydrolyse le cycle 2'3' phosphate que dans une proportion trop faible pour être mesurable dans nos conditions expérimentales .

La taille moyenne du RNA utilisé pour ces expériences a été déterminée en dissolvant 2 mg de RNA dans 1 ml. de tampon Tris/HCl 10 mM pH = 8,0. 10 µl. de suspension de phosphatase alcaline de E.Coli sont ajoutés à cette solution et le mélange incubé 15 h. à 40°C. Le pH est ensuite élevé à 14 avec KOH 1 M et la solution ainsi alcalinisée plongée 30 minutes dans un bain-marie bouillant. Après neutralisation, la solution d'hydrolysate est passée sur une petite colonne de QAE-Sephadex A-25 pour éliminer les nucléotides, et les nucléosides non retenus sont analysés comme déjà décrit. Leur somme en moles représente la quantité de moles de RNA et un rapide calcul permet de déterminer la taille du RNA de départ. En effet, seul le dernier nucléotide d'une chaîne polynucléotidique (extrémité 3' terminale) est transformé en nucléoside par ce traitement, tout le reste de la chaîne se retrouvant sous forme de nucléoside (2'), 3' phosphate.

## 2. Résultats.

### a) Dinucléosides monophosphates.

La digestion de 14 dinucléosides monophosphates par la Rnase I de *P.polycephalum*, étudiée par Mlle Anne Tuyns lors d'un travail de diplôme, a été faite avec des temps d'incubation entre 5 minutes et 24 heures. Les produits de la réaction ont été dosés après chromatographie sur échangeur d'anions. Le pourcentage de coupure au cours du temps a été calculé en divisant la quantité de nucléoside dosé au temps t par la somme nucléoside + dinucléoside monophosphate dosés à ce même temps. D'autre part, le pourcentage d'hydrolyse des nucléotides cycliques (soit le pourcentage de réaction complète : transfert du phosphate et hydrolyse) a été évalué en divisant la quantité de nucléoside 3'-phosphate par la somme : nucléoside 3' phosphate + nucléoside 2':3' phosphate cyclique trouvés dans le milieu réactionnel à un temps donné. Les résultats sont présentés au tableau VI.

TABLEAU VI.

Pourcentage de coupure des dinucléosides monophosphates en  
fonction du temps d'incubation avec la Rnase I

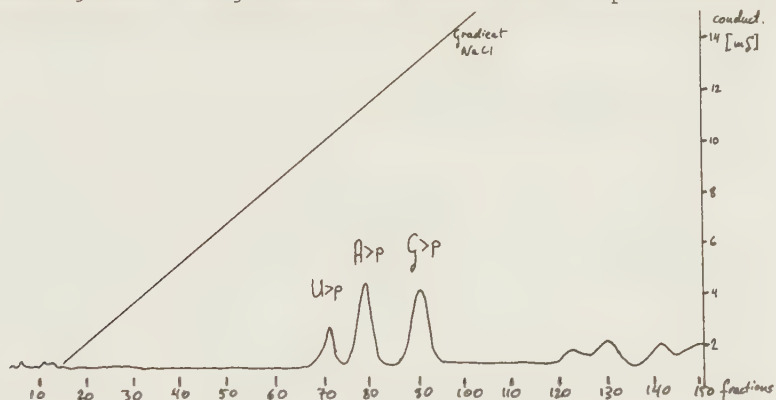
|     | 5mn | 15mn | 30mn | 1h  | 2h  | 5h  | 15h |
|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|
| ApA | 52  | 77   | 61   | 100 | 100 | 100 | 100 |
| ApC | 44  | 67   | 81   | 93  | 100 | 100 | 100 |
| ApU | 3   | 11   | 17   | 28  | 42  | 55  | 67  |
| CpA | 12  | 39   | 67   | 80  | 87  | 95  | 100 |
| CpC | 2   | 7    | 15   | 27  | 40  | 57  | 96  |
| CpG | 5   | 12   | 23   | 38  | 59  | 75  | 90  |
| CpU | 1   | 2    | 3    | 5   | 9   | 15  | 17  |
| GpA | 17  | 34   | 64   | 93  | 100 | 100 | 100 |
| GpC | 24  | 49   | 58   | 74  | 94  | 100 | 100 |
| GpU | 8   | 17   | 28   | 42  | 61  | 79  | 85  |
| UpA | 61  | 91   | 95   | 100 | 100 | 100 | 100 |
| UpC | 68  | 93   | 95   | 95  | 100 | 100 | 100 |
| UpG | 16  | 46   | 69   | 86  | 89  | 92  | 100 |
| UpU | 8   | 25   | 38   | 56  | 70  | 80  | 90  |

Pourcentage d'hydrolyse des nucléotides 2'3'cycliques (pour-  
centage de réaction complète) en fonction du temps d'incuba-  
tion avec la Rnase I

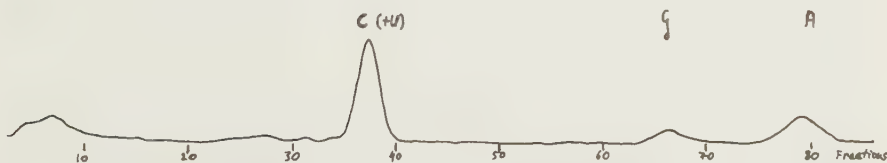
|       |    |    |
|-------|----|----|
| A > p | 12 | 20 |
| C > p | 4  | 6  |
| G > p | 8  | 10 |
| U > p | 6  | 7  |

b) RNA.

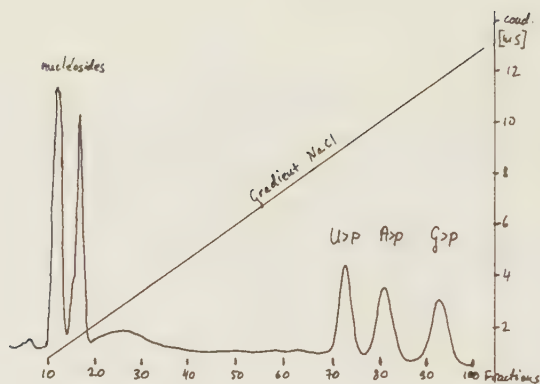
7 digestions de RNA de levure ont été faites à différents rapports enzyme substrat (de 0,02 à 5,78 unités de RNase I par mg. de RNA) et pendant des temps d'incubation allant de 15 min. à 24 heures. Les expériences 1 à 5 (Tableau VII) ont été faites avec du RNA commercial purifié (taille moyenne : 21 nucléotides) et les expériences 6 et 7 avec du RNA de haut poids moléculaire (taille moyenne : 42 nucléotides). Les figures ci-dessous représentent les chromatogrammes enregistrés à 254 nm lors de l'expérience No 7.



Mononucléotides 2'3' cycliques : chromatographie sur QAE-Sephadex A-25



Nucléosides 5'terminaux : chromatographie sur Sephadex G-10



Nucléotides 2'3' cycliques terminaux (+ mono.) : chromatographie sur QAE-Sephadex A-25

Les résultats des analyses des produits libérés par l'action de la RNase I sur le RNA à haut et à bas PM figurent au tableau VII. La colonne 1 donne le rapport enzyme substrat en unités arbitraires : unités de Rnase par mg. de RNA. Une unité de RNase par mg. de RNA représente approximativement  $5.10^{-4}$  mg/mg ou  $1.10^{-4}$  mole/mole (enzyme à substrat).

La taille moyenne des oligonucléotides libérés (colonne 3 et 4) se calcule, si on tient compte des mononucléotides isolés (colonne 3), en divisant le nombre de moles de nucléotides totaux (soit le poids de RNA divisé par 322) par la somme des quantités en moles de mononucléotides et de nucléotides 5' terminaux, et, si on ne considère que les oligonucléotides composés de deux ou plusieurs nucléotides (colonne 4), en divisant le nombre de moles de nucléotides qui se trouvent sous forme d'oligonucléotides (RNA total moins mononucléotides) par le nombre de moles de nucléotides 5' terminaux.

Les résultats ont été normalisés, afin d'être facilement comparables. En effet, pour chaque catégorie (mononucléotides, nucléotides 3' terminaux, nucléosides 5' terminaux) de nucléotides analysés (colonne 5), ce n'est pas la quantité absolue, mais la fraction de la catégorie que représente l'espèce nucléotidique considérée qui figure dans la colonne 6.

La fraction du RNA (en pour cent) incluse dans une catégorie donnée est aussi citée dans le tableau (colonne 7), ce qui permet de se rendre compte des quantités absolues mises en jeu, sachant que pour chaque expérience, la quantité de RNA engagé est de 12 mg.

TABLEAU VII.

| Exp.Enz./<br>No. subs. | Temps<br>d'hyd. | Taille moy.des<br>oligonucleotides<br>avec mono sans m. | catégorie de<br>nucléotides |     | % de chaque<br>nucl.<br>U C G A                   | % du RNA                               |                  |
|------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------|-----|---------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------|
| 1                      | 2               | 3                                                       | 4                           | 5   | 6                                                 | 7                                      |                  |
| 1                      | 0,26            | 30'                                                     | 5,7                         | 8,7 | mononucl.>P<br>nucl.2'3'>P term<br>nucl.5'OH term | 12 0 51 37<br>61 22 7 10<br>5 32 30 33 | 6,8<br><br>10,7  |
| 2                      | 0,31            | 60'                                                     | 2,8                         | 4,4 | mononucl.>P<br>nucl.2'3'>P term<br>nucl.5'OH term | 4 2 58 36<br>78 9 2 11<br>5 37 28 30   | 16,4<br><br>18,9 |
| 3                      | 0,32            | 2 h.                                                    | 2,0                         | 3,5 | mononucl.>P<br>nucl.2'3'>P term<br>nucl.5'OH term | 15 0 47 38<br>59 31 5 5<br>4 56 20 20  | 29,7<br><br>20,0 |
| 4                      | 0,25            | 22 h.                                                   | 1,8                         | 4,1 | mononucl.>P<br>nucl.2'3'>P term<br>nucl.5'OH term | 21 24 23 32<br>60 40 0 0<br>7 67 7 19  | 41,9<br><br>14,2 |
| 5                      | 0,66            | 30'                                                     | 3,4                         | 5,7 | mononucl.>P<br>nucl.2'3'>P term<br>nucl.5'OH term | 0 0 65 35<br>65 14 2 19<br>6 33 28 33  | 13,9<br><br>15,2 |
| 6                      | 0,02            | 24 h.                                                   | 4,2                         | 6,8 | mononucl.>P<br>nucl.2'3'>P term<br>nucl.5'OH term | 0 0 73 27<br>100 0 0 0<br>5 47 24 24   | 10,6<br><br>13,2 |
| 7                      | 5,78            | 15'                                                     | 2,4                         | 4,9 | mononucl.>P<br>nucl.2'3'>P term<br>nucl.5'OH term | 21 0 45 34<br>87 0 0 13<br>7 78 4 11   | 27,0<br><br>14,9 |

### 3. Discussion.

a) Les résultats de l'analyse des produits résultants de l'action de la RNase I de *P. polycephalum* sur les dinucléosides monophosphates en fonction du temps de réaction permettent de mettre en lumière une série de propriétés de cet enzyme.

La présence de nucléoside 2':3' phosphate cyclique dans les produits de réaction démontre sans équivoque que la RNase Phy I est cyclisante et catalyse la dégradation du RNA selon le mécanisme déjà cité, en deux étapes : 1) un transfert du phosphate, initialement lié au C5', sur le C2' du ribotide qui précède, avec formation d'un cycle; 2) une très lente hydrolyse de ce cycle. Sans avoir recours à des mesures cinétiques très précises, il apparaît clairement que le transfert du phosphate est beaucoup plus rapide que la solvolysse, raison pour laquelle j'ai pu négliger dans les analyses des produits de réaction de la RNase I les mononucléosides 3'-phosphates non cycliques et les nucléosides 3'-phosphates terminaux non cycliques. L'existence de ce mécanisme en deux stades permet de dire que la RNase Phy I est une polyribonucléotide 2-oligonucléotide-transférase, cataloguée sous EC 2.7.7.17 selon la commission des enzymes de l'IUB.

Tous les dinucléosides monophosphates étudiés sont couverts par la RNase I. Cependant, les vitesses de réaction sont très différentes d'un type à l'autre. La RNase I ne possède donc pas de spécificité aussi stricte que la RNase pancréatique ou la RNase T<sub>1</sub>, mais une spécificité préférentielle. De manière générale, la présence d'une purine rend la liaison qui suit ou qui précède plus sensible à son action. Ce fait est conforme à la préférence marquée de la plupart des ribonucléases des microorganismes pour les purines. Les liaisons PydpPuo, PuopPyd, et PydpPyd, par contre, font preuve d'une sensibilité diminuée, dépendant fortement de la nature, et surtout de la position, de la pyrimidine impliquée dans la liaison.

En ordonnant les dinucléosides monophosphates N'pN selon une sensibilité croissante à la RNase I, on obtient quatre séries ayant chacune un même N :

CpA < GpA < ApA < UpA

CpC < GpC < ApC < UpC

CpG < UpG

CpU < ApU < GpU < UpU

Leur examen montre que pour chaque série, CpN possède la liaison la plus résistante et UpN la plus labile. La propriété de la Rnase I de ne pas couper les liaisons CpN avait déjà été prévue par R.Braun (23) lorsqu'il a démontré la résistance particulière de poly(C) à l'action de la Rnase exocellulaire de *P.polycephalum*. D'autre part, la Rnase I montre une préférence marquée pour les liaisons UpN. La sensibilité des liaisons CpN, de plus, dépend de la nature de N, avec, dans l'ordre de sensibilité croissante : CpU < CpC < CpG < CpA.

Si l'on ordonne les dinucléosides monophosphates N'pN selon une sensibilité croissante à la Rnase I, mais cette fois-ci en gardant N' constant, il vient :

ApU < ApC < ApA

CpU < CpC < CpG < CpA

GpU < GpA < GpC

UpU < UpG < UpA < UpC

Pour chaque série, N'pU est le moins sensible. La présence de U du côté P5' (voir note) confère donc à la liaison une résistance marquée à la RNase I, mais elle est modulée par la nature du nucléotide en 3'P par rapport à la liaison. Son influence se traduit par une sensibilité croissante selon l'ordre :

CpU < ApU < GpU < UpU.

Avec un temps d'hydrolyse prolongé, les différences entre les liaisons s'estompent, les liaisons N'pU étant les seules à résister de manière appréciable, tandis que les liaisons CpN sont presque entièrement scindées (à l'exception de CpU).

---

note : la notation adoptée (36) est la suivante : les nucléotides d'une chaîne de RNA sont placés dans l'ordre conventionnel OH5'nucléotide 3'phosphate-O5'nucl.3'phos. La liaison coupée par la Rnase est la liaison P-O5'. La position d'un nucl. par rapport à la liaison coupée est notée : à gauche = nucl. 3'P, à droite = nucl.P5'.

En disposant dans une seule série tous les dinucléosides monophosphates selon l'importance croissante de leur sensibilité à la Rnase I, on a :

CpU (2) < CpC (7) < ApU (11) < CpG (12) < GpU (17) < UpU (25) < GpA (34) < CpA (39) < UpG (46) < GpC (49) < ApC (67) < ApA (77) < UpA (91) < UpC (96),

Entre parenthèses, les pourcentage de coupure après 30 min. d'incubation, pour montrer l'ordre de grandeur des différences de vitesse de réaction. A l'exception de CpA, toutes les liaisons ayant une cytidine en 3'P ou une uridine en P5' se trouvent parmi les plus résistantes, celle qui les juxtapose ,CpU, étant évidemment la plus résistante.

En résumé, ces propriétés conduisent à définir une spécificité pour la Rnase I de *P. polycephalum*. Cette spécificité est d'ordre cinétique puisque la coupure d'une liaison donnée est catalysée avec une vitesse très différente selon la nature des nucléotides réunis par cette liaison, mais que toutes les liaisons peuvent être coupées. La comparaison avec la spécificité de RNases telles la RNase pancr., qui ne catalyse la coupure qu'au niveau de certains nucléotides bien déterminés, incite à définir la spécificité de la Rnase I de *P. polycephalum* comme une "séléctivité négative". En effet, la résistance de certaines liaisons à l'action de la Rnase I est le phénomène le plus intéressant en vue de l'analyse séquentielle du RNA. Cet aspect sera développé dans la conclusion de ce chapitre. Enfin, il faut remarquer l'importance de la spécificité s'exerçant sur le nucléotide P5', dont l'effet est, dans la cas de la Rnase I, plus important que la spécificité sur le nucléotide 3'P, alors que c'est celui qui dicte la séléctivité des RNases spécifiques. La RNase I ne catalyse donc que faiblement la rupture des liaisons avec C en 3'P et surtout U en P5'.

La position de CpU, premier, et de UpC, dernier, dans l'ordre des sensibilités croissantes, permet de supposer que la RNase I possède un centre actif doté de points de reconnaissance subdivisés en sous-site linéaire de part et d'autre du site catalytique proprement dit, couvrant au moins la distance occupée par deux nucléotides et le phosphate qui les relie. Des recherches récen-

tes (37) ont démontré pour la Rnase T<sub>1</sub> l'existence d'un site de reconnaissance plus étendu encore.

b) Les expériences de dégradation du RNA par la Rnase I ont été faites en vue d'établir si elle avait la même spécificité à l'égard d'un substrat naturel de PM plus grand. Si c'est bien le cas, la préférence pour les purines en 3'P et en P5' par rapport à la liaison coupée doit se traduire par une forte proportion de purines dans la fraction mononucléotides. Ceci est confirmé par toutes les expériences faites, à l'exception de l'expérience No 4, pour laquelle le temps d'incubation a été suffisamment grand pour entraîner une égalisation de la représentation de chaque espèce ribotidique dans la fraction "mononucléotides". (l'expérience 6, dont le temps d'incubation a été aussi long que dans l'exp. 4, a été faite avec un rapport enzyme/substrat dix fois plus faible, ce qui modifie considérablement le résultat).

La résistance des liaisons ayant une uridine en P5' et la grande vitesse de coupure des liaisons avec U en 3'P doivent se manifester par une faible proportion de U dans les fractions mononucléotides et nucléosides 5'-terminaux et par une prépondérance de ce nucléotide dans la fraction 3'-terminaux. L'expérience la plus concluante dans ce cas est l'expérience No 6, où on trouve 100 % de U dans les nucléotides 3'-terminaux, 0 % dans les mononucléotides et 5 % dans les nucléosides 5'-terminaux.

La résistance des liaisons avec C en 3'P sera démontrée par des quantités faibles de C dans les mononucléotides et dans les nucléotides 3'-terminaux, et fortes dans les nucléotides 5'-terminaux. Dans toutes les expériences, C est le nucléotide le plus représenté dans la fraction 5'-terminaux et le moins représenté dans les mononucléotides. L'expérience No 7, avec un rapport enzyme/substrat élevé et un temps d'incubation faible, met le mieux en valeur la spécificité de la Rnase I. En effet, les résultats de cette expérience montrent simultanément une haute quantité relative de U dans les nucléotides 3'-terminaux et de C dans les 3'-terminaux. Tous ces résultats confirment donc sans

équivoque la spécificité illustrée par les expériences de digestion de dinucléosides monophosphates.

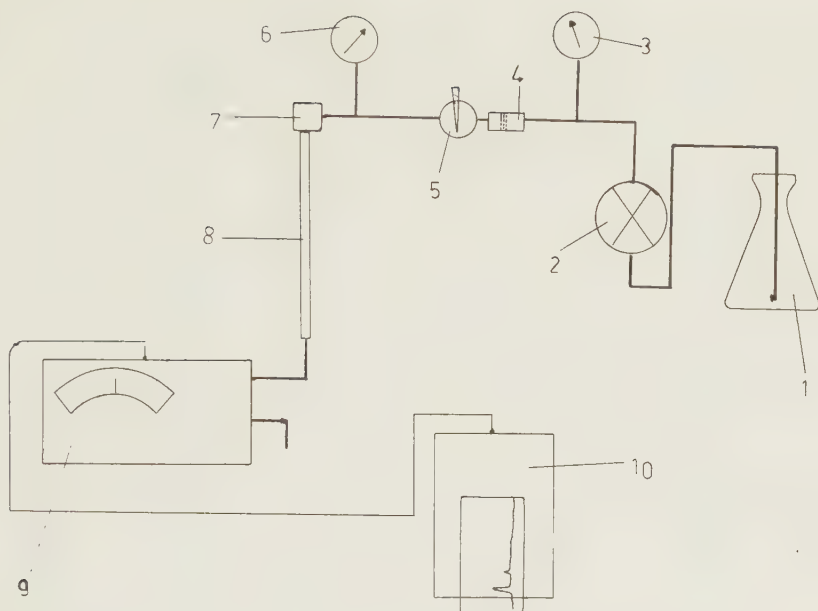
D'autre part, les résultats des analyses des extrémités des fragments de RNA montrent clairement que cette dégradation est endonucléolytique, car la taille moyenne des oligonucléotides diminue fortement dans les premiers stades de la réaction, sans pour autant que les mononucléotides augmentent proportionnellement dans le mélange réactionnel. La RNase Phy I est donc une endonucléase, conformément à toutes les ribonucléases cyclisantes connues.

## C. SPECIFICITE DE LA RNASE II.

### 1. Matériel, méthodes.

Les produits chimiques et les enzymes sont les mêmes que pour l'étude de la Rnase I.

Le dispositif de chromatographie à haute pression, monté dans notre laboratoire par M. Juillerat et moi-même, est composés des pièces suivantes, les numéros se rapportant au schéma de l'appareil ci-dessous :



1. Réservoir de tampon
2. Pompe microdoseuse Orlita DMP-SK 15, débit max.:  $560 \text{ cm}^3/\text{h}$ .  
(Orlita, Giessen, BRD)
3. Manomètre ( $1 - 400 \text{ kg/cm}^2$ ), utilisé pour amortir les écarts de pression.
4. Filtre Hoke no 2233 ( $10-15 \mu$ ) (Hoke inc. Cresskill, N.J.)
5. Vanne Micromite Hoke.
6. Manomètre ( $0-150 \text{ kg/cm}^2$ ) mesurant la pression de travail.
7. Injecteur à septum Perkin Elmer.
8. Colonne Partisil-10 SAX (anions) ou SCX (cations) 26 cm. (long.)  
 $\times 4,6 \text{ mm}$  ( $\varnothing$  int.)  $\times \frac{1}{8}''$  ( $\varnothing$  ext.) (Whatmann, Clifton, N.J.)
9. Moniteur UV Cecil 212 (Cambridge, GB), avec étendue d'échelle réglable de 0,01 à 2 unités d'absorbance.
10. Enregistreur.

Conduites : 1 - 2, teflon. 2 - 5, acier inox 316 Ø ext = ¼"  
              5 - 7, " " Ø ext = 1/16"  
              système-manomètres, " " Ø ext = 1/8"

Raccords : 2 - 7 : Gyrolok(Hoke), dès 7 : Svalgelok.

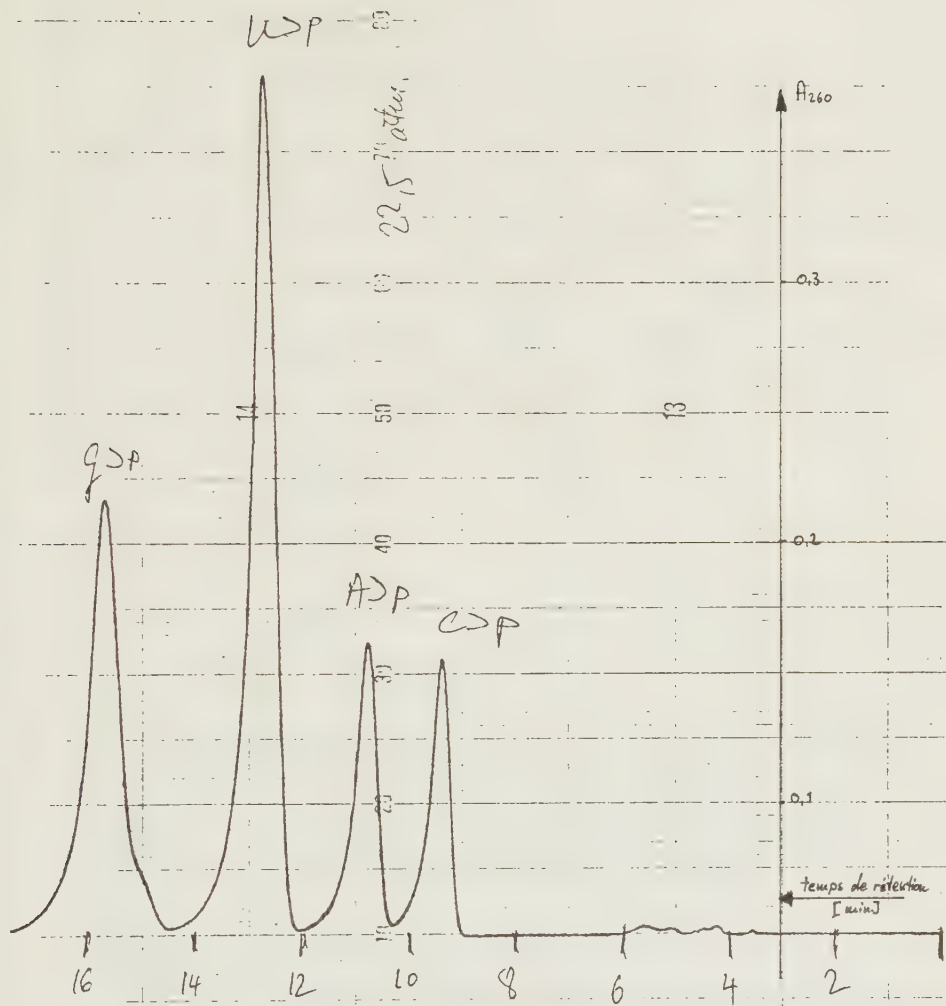
Les tampons utilisés sont : pour la colonne échangeuse d'anions, un tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 3,70, conductivité = 1,19 mS/cm. et pour la colonne échangeuse de cations, un tampon phosphate d'ammonium 0,1 M, pH = 2,45, conductivité = 6,2 mS/cm. Ces tampons sont conseillés par le fabricant des supports de chromato.; le premier tampon est réservé à l'analyse des nucléotides sur Partisil-10 SAX, le second à l'analyse des bases nucléiques sur Partisil-10 SCX. les concentrations et les pH ont été modifiés pour permettre l'analyse des nucléotides 2':3' cycl. et des nucléosides sans gradient de concentration en sel ou de pH, de sorte que les analyses puissent se suivre rapidement, puisque la colonne n'a pas besoin de régénération entre deux analyses successives.

La pression de travail au sommet de la colonne se situe entre 20 et 25 kg/cm<sup>2</sup>, mais peut être plus élevée pour l'analyse des produits de digestion des dinucléosides monophosphates. Le débit correspondant à une pression de 25 kg/cm<sup>2</sup> est d'environ 100 ml/h.

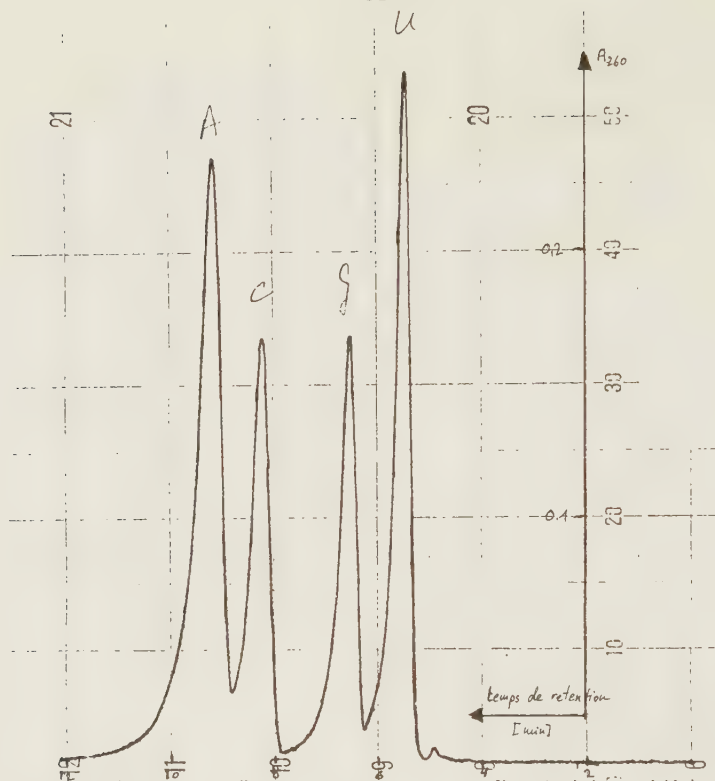
Les injections ont été faites avec une seringue Hamilton résistant à la pression de 5 ou 50  $\mu$ l, à aiguille biseautée.

Le moniteur UV est réglé à la longueur d'onde de 260 nm (280 pour l'analyse de la cytidine), le déroulement du papier de l'enregistreur se fait à 1 cm/min.

Les figures suivantes sont des photocopies des chromatogrammes des témoins: nucléotides 2'3'cycliques et nucléosides.



Chromatographie des nucléotides 2'3' cycliques phosphate sur  
 Partisil-10 SAX. Concentration : env. 5 mM. Prise de 20  $\mu$ l.  
 Pression : 22,5 kg/cm<sup>2</sup>.



Chromatographie des nucléosides sur Partisil-10 SCX. Concentration : env. 5 mM. Injection de 20  $\mu$ l. Pression : 25 kg/cm<sup>2</sup>.  
Etendue de l'échelle du moniteur UV : 0,5 unités d'abs. à 260nm.

La surface des pics est mesurée au planimètre, et, rapportée à celle des témoins, permet de calculer la concentration de chaque nucléoside ou nucléotides dans un mélange réactionnel donné. La linéarité de la réponse du moniteur UV a été démontrée (voir chapitre suivant et (31) de 0,01 à 5 mM en nucléoside ou nucléotide.

a) Hydrolyse des dinucléosides phosphates.

Une quantité de 0,1 mg. de dinucléoside monophosphate est dissoute dans 500  $\mu$ l de tampon citrate de sodium 10 mM pH = 3,1. Un volume de 20  $\mu$ l de cette solution est chromatographié sur Partisil SAX pour déterminer la valeur de référence de la concentration du substrat au temps  $t = 0$ . Une prise de 5  $\mu$ l de RNase II (à 9,8 U/ml dans une solution de glycérol à 40 % et un tampon citrate à pH = 3,1) est ensuite ajoutée dans la première série d'expériences, ou une prise de 50  $\mu$ l dans la deuxième série. Le mélange est incubé à 40°C, puis 20  $\mu$ l du milieu de réaction sont prélevés au temps  $t$  pour être chromatographiés immédiatement sur Partisil SAX. Les quantités de chaque produit de réaction sont mesurées en fonction du temps.

b) Digestion du RNA.

Le principe de l'analyse des produits de la digestion du RNA par la Rnase II est le même que pour la Rnase I. Cependant, comme l'hydrolyse des cycles 2'3'phosphate n'est pas négligeable dans le cas de la Rnase II, les mononucléosides 3'phosphate et les extrémités 3'phosphate non cycliques ont aussi été analysés. A cet effet, à 2 ml. de la solution résultant de l'action de la Rnase II sur le RNA (solution de départ) sont ajoutées 10  $\mu$ l de suspension de phosphatase de E.Coli. Ce mélange est incubé pendant une nuit à 40°C. Le pH de la solution est alors amené à 14 par KOH 1 M et le mélange alcalin est chauffé pendant 30 min au bain marie bouillant. Les nucléosides sont analysés sur Partisil SCX, après élimination des nucléotides.

Les chromatographies sur QAE-Sephadex sont ici remplacées par la chromatographie d'une prise de 20  $\mu$ l de solution à analyser sur Partisil-10 SAX (conditions déjà décrites). Les chromatographies des nucléosides sur Sephadex G 10 sont remplacées par la chromatographie de 20  $\mu$ l de la solution à analyser (débarassée des nucléotides contaminants par passage de la solution sur une petite colonne de Sephadex QAE A-25) sur Partisil

10 SCX.

Deux séries d'expériences ont été faites, l'une à partir d'un mélange réactionnel contenant 3 mg de RNA, 6 ml de tampon citrate de sodium 10 mM à pH = 3,1 et 0,3 ml de RNase II (même solution que ci-dessus), et l'autre à partir d'un mélange de 4,5 mg de RNA, 7 ml de tampon et 2 ml de RNase II. Chaque mélange a été incubé à 40°C et une aliquote prélevée au temps t pour être soumise aux quatre déterminations analytiques : nucléosides-5'-terminaux, nucléosides-2':3' phosphates cycliques terminaux et nucléosides terminaux 3'-phosphates non cycliques, comme déjà décrit,

## 2. Résultats.

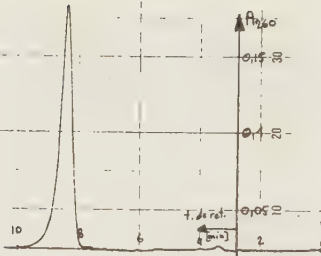
a) La dégradation des 16 dinucléosides-monophosphates a été faite avec deux concentrations de RNase II. L'analyse des produits de réaction par HPLC après différents temps d'incubation est résumée dans le tableau VIII. La première série d'expériences a été faite avec un rapport enzyme-substrat de 0,49 unités de RNase II par mg de RNA, et la seconde avec 4,9 U/mg. Les dinucléosides déjà détruits entièrement à la faible concentration d'enzyme (GpA, GpU, GpG) n'ont pas été analysés dans le cadre de cette seconde expérience. Le pourcentage de réaction complète ne figure pas dans le tableau, il se situe entre 15 et 80 %.

Les figures qui suivent sont des photocopies réduites des chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des produits de réaction de GpA et UpA avec la RNase II.

TABLEAU VIII.

Pourcentage de scission des dinucléosides monophosphates en fonction du temps d'incubation avec la Rnase II de P. polycephalum

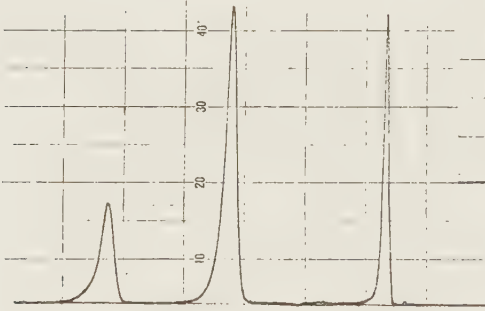
| Substrat | Expérience 1<br>rap. enz/sub = 0,49 |     |     | Expérience 2<br>rap. enz/sub = 4,9 |     |     |
|----------|-------------------------------------|-----|-----|------------------------------------|-----|-----|
|          | temps d'incubation                  |     |     |                                    |     |     |
|          | 10'                                 | 1 h | 2 h | 10'                                | 1 h | 2 h |
| ApA      | 0                                   | 0   | 0   | 3                                  | 14  | 63  |
| ApC      | 0                                   | 0   | 0   | 1                                  | 5   | 54  |
| ApG      | 0                                   | 0   | 0   | 4                                  | 20  | 100 |
| ApU      | 0                                   | 0   | 0   | 1                                  | 3   | 26  |
| CpA      | 3                                   | 10  | 16  | 15                                 | 44  | 76  |
| CpC      | 0                                   | 0   | 0   | 1                                  | 6   | 35  |
| CpG      | 72                                  | 193 | 878 | 23                                 | 35  | 51  |
| CpU      | 0                                   | 0   | 0   | 3                                  | 12  | 75  |
| GpA      | 35                                  | 75  | 95  | -                                  | -   | -   |
| GpC      | 5                                   | 20  | 40  | 40                                 | 96  | 100 |
| GpG      | 29                                  | 60  | 100 | -                                  | -   | -   |
| GpU      | 15                                  | 42  | 100 | -                                  | -   | -   |
| UpA      | 8                                   | 22  | 43  | 60                                 | 99  | 100 |
| UpC      | 0                                   | 0   | 0   | 3                                  | 12  | 80  |
| UpG      | 15                                  | 32  | 58  | 60                                 | 99  | 100 |
| UpU      | 0                                   | 0   | 0   | 6                                  | 33  | 100 |



temps d'incubation = 0

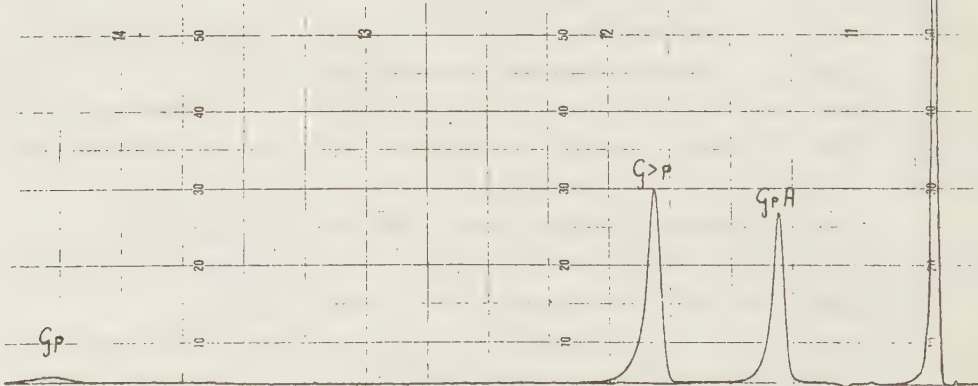


$t = 5$  min.

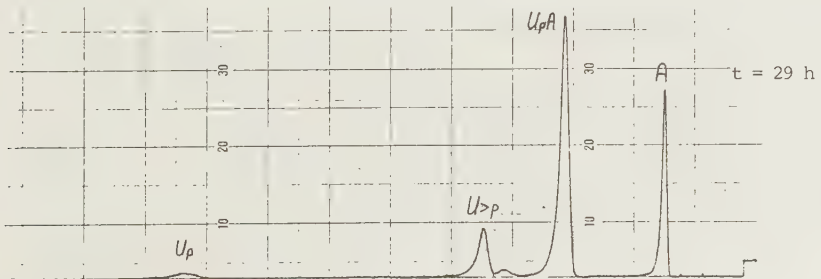
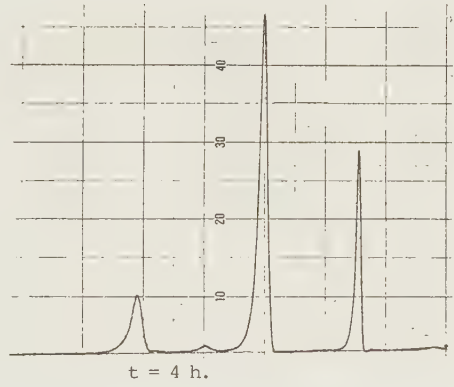
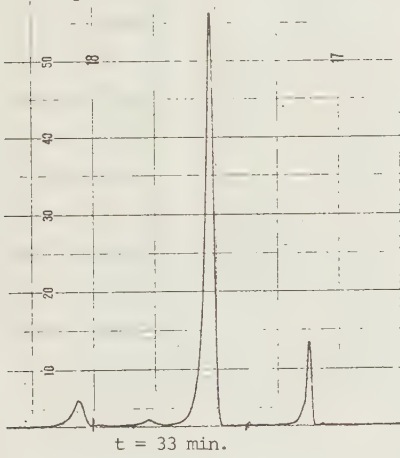
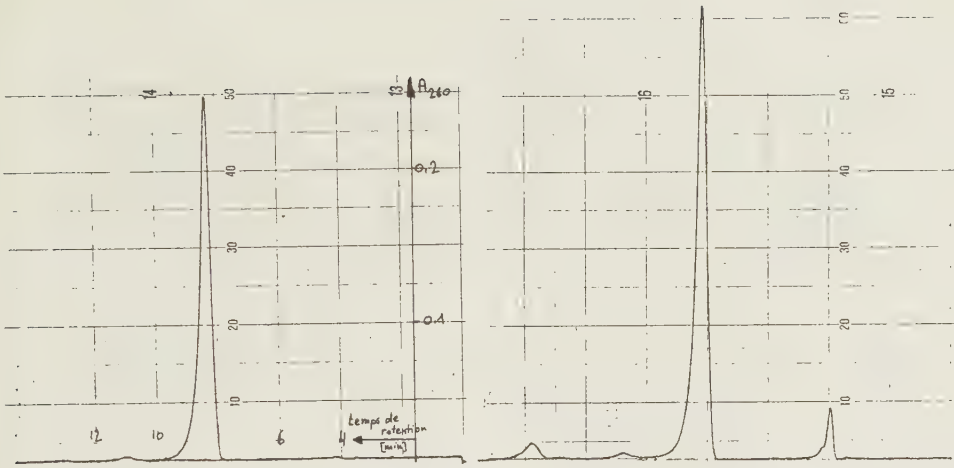


$t = 20$  min

$t = 60$  min.



Digest. de  $G_P A$  par Rnase II. Chromato. sur Partisil SAX. Press. : 30 atm



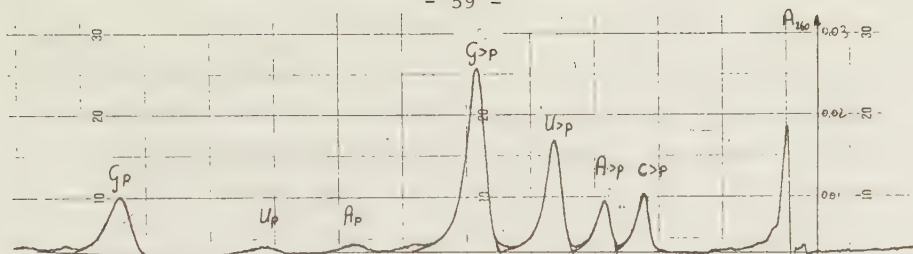
Dig. de U<sub>p</sub>A par Rnase II. Chromato. sur Partisil SAX. Pression : 30 atm.

b) Les résultats des analyses des fragments de RNA résultant de l'action de la Rnase II sont présentés dans le tableau IX de la même façon que pour la Rnase I. Une photocopie réduite des chromatogrammes des diverses fractions est donnée pour illustrer la technique d'analyse par HPLC.

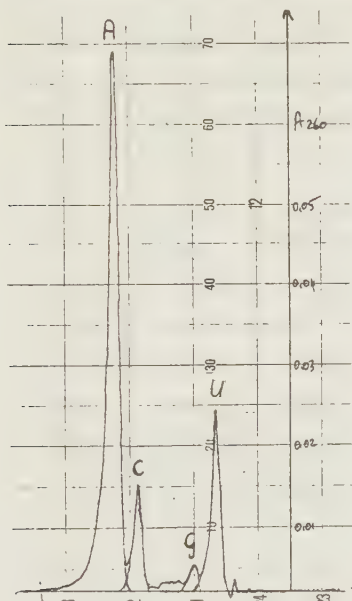
TABLEAU IX.

| Exp.Enz./<br>No. subs. | Temps<br>d'inc. | Taille moy.des<br>oligonucléotides<br>avec mono sans m. | catégorie de<br>nucléotides | % de chaque<br>nucl.<br>U C G A | % du RNA                                    |             |      |
|------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------|-------------|------|
| 1                      | 2               | 3                                                       | 4                           | 5                               | 6                                           | 7           |      |
| 1                      | 0,98            | 30'                                                     | 3,4                         | 5,9                             | mononucl.<br>nucl.5'term.<br>nucl.3'term.   | 14 4 81 1   | 15,4 |
|                        |                 |                                                         |                             |                                 |                                             | 28 15 10 47 | 14,4 |
|                        |                 |                                                         |                             |                                 |                                             | 46 49 0 5   |      |
| 2                      | 0,98            | 1h30'                                                   | 2,4                         | 5,2                             | mononucl.<br>nucl.5'term.<br>nucl.3'term.   | 19 10 67 4  | 28,5 |
|                        |                 |                                                         |                             |                                 |                                             | 26 18 6 50  | 13,8 |
|                        |                 |                                                         |                             |                                 |                                             | 44 52 0 4   |      |
| 3                      | 0,98            | 8 h                                                     | 1,8                         | 3,9                             | mononucl.<br>nucl. 5'term.<br>nucl. 3'term. | 19 11 61 9  | 42,0 |
|                        |                 |                                                         |                             |                                 |                                             | 25 18 6 51  | 14,6 |
|                        |                 |                                                         |                             |                                 |                                             | 42 55 0 3   |      |
| 4                      | 4,35            | 20'                                                     | 1,9                         | 2,9                             | mononucl.<br>nucl. 5'term.<br>nucl. 3'term. | 22 8 62 8   | 28,4 |
|                        |                 |                                                         |                             |                                 |                                             | 22 18 3 57  | 23,9 |
|                        |                 |                                                         |                             |                                 |                                             | 34 29 22 15 |      |
| 5                      | 4,35            | 40'                                                     | 1,5                         | 2,5                             | mononucl.<br>nucl. 5'term.<br>nucl. 3'term. | 21 11 59 9  | 40,2 |
|                        |                 |                                                         |                             |                                 |                                             | 21 15 1 63  | 24,2 |
|                        |                 |                                                         |                             |                                 |                                             | 22 19 43 16 |      |
| 6                      | 4,35            | 60'                                                     | 1,5                         | 2,4                             | mononucl.<br>nucl. 5'term.<br>nucl. 3'term. | 22 9 60 9   | 44,0 |
|                        |                 |                                                         |                             |                                 |                                             | 28 18 0 54  | 22,8 |
|                        |                 |                                                         |                             |                                 |                                             | 16 29 46 9  |      |

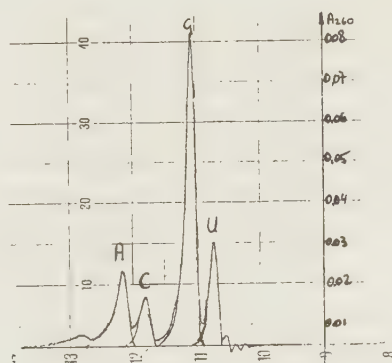
note : la fraction mononucléotides représente la somme des mononucléotides 2':3'-cycliques et des mononucléotides 3'-phosphates. De même pour la fraction nucléotides 3'-terminaux, qui est la somme des cycliques et des non cycliques.



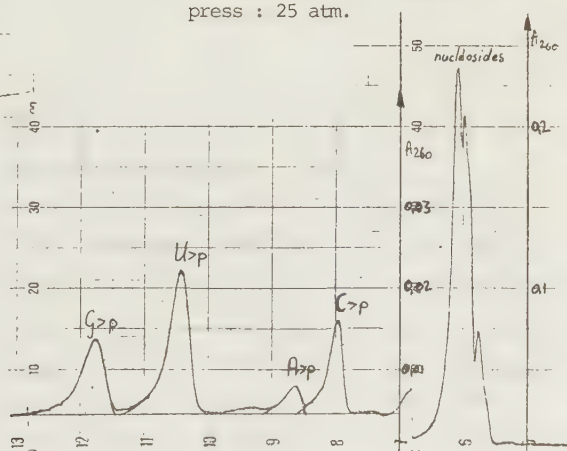
Mononucléotides cycliques et non cycliques. Partisil SAX. Press.: 22,5 atm.



5'term. Partisil SCX.



3'term. non cycl. Partisil SCX  
press : 25 atm.



3'term.cycliques. Partisil SAX.

Analyse des extrémités des fragments de RNA après action de Rnase II.

### 3. Discussion.

a) Le dosage des produits de réaction des dinucléosides monophosphates avec la Rnase II de *P. polycephalum* permet de caractériser cet enzyme du point de vue de sa spécificité. La Rnase II est une ribonucléase cyclisante, comme le montre l'apparition de l'intermédiaire 2':3'-phosphate cyclique. Celui-ci est hydrolysé en nucléoside 3'-phosphate au cours d'une phase plus lente que le transfert de phosphate, mais ici nullement négligeable (comme c'était le cas pour la RNase I). Le numéro d'ordre EC 2.7.7.17 peut donc aussi être appliqué à la RNase II de *Physarum polycephalum*.

Tous les dinucléosides-monophosphates sont coupés par la Rnase II, mais avec des vitesses de réaction très différentes. A cet égard, les liaisons internucléotidiques se répartissent en trois groupes :

- Les liaisons GpPuo sont coupées plus rapidement que toutes les autres.
- Les liaisons Pyd-p-Puo et Guo-p-Pyd sont coupées lentement.
- Les liaisons ApN et Pyd-p-Pyd ne sont pratiquement pas touchées si les conditions de l'expérience sont assez menagées (Expérience 1).

La Rnase II de *P. polycephalum* montre donc une spécificité d'ordre cinétique. D'autre part, comme dans le cas de la Rnase I, il semble que l'enzyme reconnaisse non seulement le nucléotide de gauche (situé du côté 3'P de la liaison coupée), mais aussi celui de droite (P5'). En effet, si les séries NpN', disposées selon un ordre de sensibilité croissante à la Rnase II, finissent toutes par GpN', pour chaque N' on obtient :

ApU > CpU > UpU > GpU

ApC > CpC > UpC > GpC

ApG > CpG > UpG > GpG

ApA > CpA > UpA > GpA

et commencent toutes par ApN', montrant par-là une spécificité

s'exerçant sur le nucléotide 3'P, les séries NpN'placées dans le même ordre avec un N donné :

GpC < GpU < GpA < GpG

ApU < ApC < ApA < ApG

UpC < UpU < UpA < UpG

CpC < CpU < CpA < CpG

finissent toutes par NpG et commencent toutes par NpPvd, ce qui démontre une spécificité s'exerçant sur le nucléotide P5'.

On peut constater que la Rnase II a une nette préférence pour G, des deux côtés de la liaison coupée, ce qui permet de la comparer aux nombreuses ribonucléases "guanine" spécifiques des microorganismes. D'autre part, la présence de A du côté 3'P rend la liaison résistante à la Rnase II, alors que A de l'autre côté (P5') favorise la coupure. Enfin, la présence de pyrimidine d'un côté ou de l'autre de la liaison attaquée donne à cette dernière une résistance marquée.

b) Les analyses des produits de réaction du RNA de levure avec la Rnase II confirment ces résultats. Le premier phénomène important à remarquer est la libération considérable de guanosine monophosphate dans la fraction "mononucléotides", et ceci dès les premiers stades de la réaction (expérience 1). On peut calculer que pour l'expérience 6, pratiquement toute la guanosine se retrouve dans cette fraction. Ceci démontre la préférence de la Rnase II pour les liaisons possédant un G en 3'P ou en P5'.

La prépondérance très nette de A en 5'OH-terminal, de même que sa faible proportion en 3'terminal et dans la fraction "mononucléotides" s'explique par la résistance des liaisons ApN et par la plus grande facilité avec laquelle la Rnase II coupe les liaisons possédant une adénosine en P5'.

La différence entre les pyrimidines est peu significative, bien que la proportion de C en 5'terminal, plus faible que celle de U, puisse provenir d'une plus grande résistance des liaisons NpC comparées aux liaisons NpU.

Comme dans le cas de la Rnase I, les résultats de l'a-

nalyse des fragments de RNA résultant de sa digestion par la RNase II montrent que cet enzyme est aussi une endonucléase.

#### D. CONCLUSION.

J'ai démontré par les résultats expérimentaux contenus dans ce chapitre que les deux ribonucléases exocellulaires extraites du milieu de culture de *Physarum polycephalum* possèdent une spécificité intéressante, assez différente de celle de toutes les ribonucléases connues. R. Braun (23) avait déjà montré la résistance de poly(C) à l'hydrolyse par la RNase I. Fiers & al., au moyen de notre préparation, ont utilisé cette propriété de la RNase I pour isoler les séries de C comprises dans les oligonucléotides  $T_1$  dérivés du RNA de virus MS 2 (39). D'autre part, le prof. Billeter (EPFZ) (communication personnelle) a expérimenté l'action de nos deux RNases sur divers oligonucléotides marqués, trouvant des produits d'hydrolyse tout à fait conformes à la spécificité décrite ici.

Dans les travaux de séquence du RNA, les séries de pyrimidines posent des problèmes difficiles à résoudre, principalement dans le cas où plusieurs cytidines sont enchaînées en succession. L'action de la RNase I de *P. polycephalum* permet dans ce cas d'isoler ces séries intactes, éventuellement suivies d'un U, à cause de la résistance particulièrement élevée des liaisons CpC et CpU.

D'autre part, même si d'autres techniques sont accessibles, comme par exemple la modification chimique des pyrimidines (20), l'usage de la RNase I pourrait permettre d'élucider plus facilement la séquence d'oligonucléotides provenant d'une digestion du RNA par la RNase  $T_1$ . Parmi les 43 tetranucléotides possibles dans les produits de réaction du RNA avec la ribonucléase pancréatique ou la RNase  $T_1$  (21), il n'en existe que quatre dont la séquence ne soit pas identifiable après l'action consécutive des deux ribonucléases : C(UC)G d'une part et U(CU)G d'autre

part, chaque paire possédant la même composition globale et les mêmes extrémités. La dégradation de C(UC)G par la Rnase I de *P. polycephalum* devrait donner CU, CG, C et G, si la séquence est CUCG, alors que CCU et G serait dérivé d'une séquence CCUG. De même, UUCG donnerait U, CU et G, mais UUCG donnerait U, CG, C et G. De plus, parmi les 42 séquences de pentanucléotides non identifiables après action de la Rnase pancréatique suivie de  $T_1$ , la Rnase Phy I pourrait permettre d'en élucider 31. Par exemple, les 6 pentanucléotides C(ACU)G devraient se décomposer sous l'action de la Rnase I en produits différents selon leur séquence, à l'exception de CACUG et CUCAG, qui sont d'ailleurs identifiables l'un par rapport à l'autre par action de la Rnase pancréatique. Ainsi, CACUG donnerait : CA, CU, G (C, A)

|       |   |                   |
|-------|---|-------------------|
| CUACG | " | CU, A, CG (C,G)   |
| CAUCG | " | CAU, CG (C,AU,G)  |
| CCAUG | " | CCAU, G (CC,AU,G) |
| CCUAG | " | CCU, A, G         |
| CUCAG | " | CU, CA, G (C,A)   |

L'emploi de la Rnase Phy II dans les travaux de séquence semble moins prometteur. Cependant, sa nette préférence pour les liaisons Guo-p-Puo pourrait permettre d'obtenir des fragments d'une longueur double en moyenne des fragments libérés par  $T_1$ , et faciliter l'identification de certains recouvrements. D'autre part, il est possible d'envisager un usage de la Rnase II pour élucider certains types de séquence de fragments issus de la digestion du RNA par la Rnase pancréatique ou la Rnase  $T_1$ , par exemple dans l'isolement de séries de A ou de séquences Ado-p-Pyd. La Rnase II peut aussi servir de complément à la Rnase  $U_2$ .

Il faut toutefois rappeler ici (voir introduction p. 6) l'usage de la Rnase pancréatique carboxyméthylée au site actif, qui permet d'isoler des séries de pyrimidines, et surtout l'emploi des méthodes de modification chimique du RNA, permettant théoriquement d'isoler des séries de C ou de U. Cependant, cette dernière méthode présente l'inconvénient majeur de demander des opérations chimiques qui provoquent des pertes importantes de matériel.

Pour terminer, j'aimerais souligner l'intérêt de la technique de chromatographie en phase liquide sous haute pression appliquée à la séparation des nucléotides cycliques ou non et des nucléosides dans la détermination de la spécificité d'une ribonucléase à l'égard de certaines bases nucléiques bien définies. En effet, si les techniques plus traditionnelles de chromatographie sur Sephadex échangeur d'ion ont permis de définir en plusieurs mois la spécificité de la RNase I, la technique HPLC permet par contre d'obtenir le même résultat en quelques semaines. Il est même possible d'envisager l'utilisation de cette méthode pour étudier la réactivité de tri- ou tetra-nucléotides avec la ribonucléase, ceci afin de définir plus précisément l'étendue du site de reconnaissance de l'enzyme.

## V. MESURE DE QUELQUES CONSTANTES CINÉTIQUES.

### 1. INTRODUCTION.

Pour tenter de compléter les indications qualitatives sur la spécificité de la Rnase I de *P. polycephalum* données dans le chapitre précédent, j'ai mesuré quelques constantes de Michaelis caractérisant la réaction de cet enzyme envers divers substrats. Dans une première approche, j'ai utilisé pour mesurer les vitesses de réaction une méthode spectrophotométrique (40-42) basée sur la différence d'absorbance entre le substrat intact et le substrat scindé par la Rnase. Cette méthode présente l'avantage de permettre de suivre la réaction de manière continue et dès son début, donc de donner une bonne estimation de la vitesse initiale  $v_0$ . Par contre, l'absorbance des purines et des pyrimidines est telle qu'il est très difficile de travailler avec des concentrations en substrat supérieures à  $10^{-4}$  M. La méthode spectrophotométrique est donc valable si le  $K_M$  d'un substrat est du même ordre. Elle ne donne qu'une limite inférieure si le  $K_M$  est plus grand que cette valeur. Comme les valeurs de  $K_M$  trouvées pour les substrats de la RNase I sont souvent de l'ordre de  $10^{-3}$  M ou plus, j'ai dû mesurer les vitesses de réaction par dosage des produits de dégradation formés au cours du temps, et ceci par chromatographie d'aliquotes du mélange réactionnel sur Partisil SAX (HPLC). Cette manière de procéder, longue et fastidieuse, donne des résultats souvent difficiles à interpréter à cause de l'addition de nombreuses erreurs expérimentales aléatoires d'une part et de la détermination trop peu précise des vitesses initiales d'autre part. J'ai utilisé les méthodes graphiques de Lineweaver et Burk (43) et de Eadie (44). De plus, j'ai tenté de confronter les résultats obtenus par ces méthodes avec ceux tirés de l'équation de Michaelis intégrée, selon les méthodes de Foster et Niemann (45,46), de Muller et Talsky (47) et de Cornish-Bowden (48), ces deux dernières pour la détermination de la vitesse initiale

lorsque la réaction est inhibée par ses propres produits. Dans tous les cas, les valeurs des constantes ont été calculées à partir des coefficients des droites de régression linéaire données par l'application de la méthode des moindres carrés aux données expérimentales.

## 2. Détermination du $K_M$ de UpC, ApC, GpU par la méthode spectrophotométrique.

### a) Méthode.

Une solution stock de substrat est préparée contenant 1 mg/ml dans du tampon acétate de sodium 10 mM à pH 4,50. Diverses dilutions de cette solution sont faites dans le même tampon. La solution de substrat diluée (3 ml.) est placée dans une cuvette de quartz, et celle-ci dans le spectrophotomètre, dans un compartiment thermostatisé à 40°C. Après équilibration à la température de réaction, 15  $\mu$ l ou 50  $\mu$ l de solution de RNase I sont ajoutés (sol. stock de RNase I identique à celle employée pour les déterminations de spécificité). L'absorbance du mélange réactionnel à 260 nm est alors immédiatement enregistrée en fonction du temps.

### b) Résultats.

Pour chaque substrat, 5 mesures de la vitesse initiale de réaction, utilisant 3 concentrations différentes d'enzyme, ont été faites. Les données fournies par ces expériences se sont toutefois révélées presque inutilisables. En effet, comme déjà dit plus haut, les variations de concentration du substrat sont limitées à une valeur maximum, située vers  $10^{-4}$  M, à partir de laquelle aucune mesure n'est possible, à cause de la grande absorbativité molaire des composés nucléotidiques. Dans ces conditions de concentration, la courbe de Michaelis représentant la vitesse de réaction en fonction de la concentration du substrat est pratiquement linéaire au lieu d'être hyperbolique, ce qui a pour conséquence que les variations de vitesses observables relativement à la concentration du substrat sont plus faibles que les erreurs expérimentales. Le diagramme de Eadie présente alors des points si dispersés qu'il est impossible d'en tirer les valeurs des constantes. Le

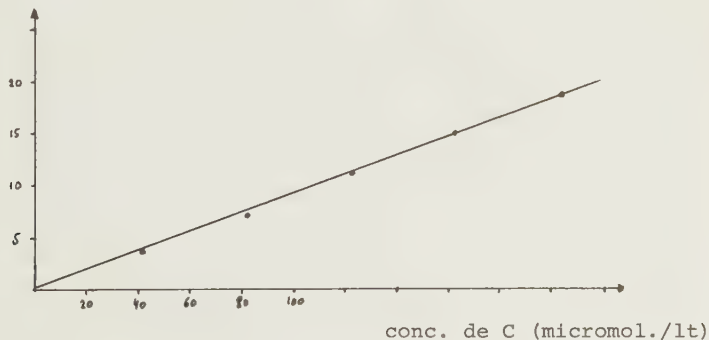
diagramme de Lineweaver et Burk, toutefois, permet d'estimer grossièrement des valeurs minimum de  $K_M$  d'environ 0,5 mM pour UpC, 0,2 mM pour ApC et 0,25 mM pour GpU. La détermination directe de la vitesse de réaction à des concentrations de substrat plus élevée pourrait être obtenue en suivant la réaction au pH-stat (seulement pour la deuxième étape : hydrolyse), ou mieux encore en suivant les variations de dichroïsme circulaire.

### 3. Détermination des constantes cinétiques par la méthode chromatographique.

#### a) Méthode : 1) Calibration.

Pour mesurer les quantités de produit formé, il est nécessaire de posséder des valeurs de référence de hauteur de pics en chromatographie. Ces valeurs s'obtiennent par chromatographie de 5  $\mu$ l de solution de témoin à diverses concentrations connues. La hauteur du pic de chromatographie est alors portée sur un graphique en fonction de la concentration de l'échantillon injecté et la courbe d'étalonnage ainsi obtenue pour chaque produit possible permet de calculer les concentrations des produits formés au cours de la réaction enzymatique. L'expérience a montré que la droite d'étalonnage est linéaire pour des concentrations variant de  $2 \times 10^{-5}$  M à  $3 \times 10^{-3}$  M. La figure ci-dessous donne la courbe d'étalonnage obtenue pour la cytidine et les chromatogrammes y-relatifs, l'étendue d'échelle du moniteur UV étant de 0,05 unités d'absorbance.

haut. du pic  
à sens. 0,05  
(cm)





40.77 81.54 122.3 163.1 203.9 micromoles/lit.

## 2) Mesure des vitesses de réaction.

Le mélange réactionnel, d'un volume de 100  $\mu$ l, contient du substrat et de la Rnase I en concentrations variables, obtenues par une dilution adéquate des solutions-stock de ces deux substances dans du tampon acétate de sodium 0,1 M pH = 4,50. La solution stock de Rnase I est la même que ci-dessus, celle de substrat est d'environ 10 mM dans le tampon acétate. Le mélange est incubé à 40°C sitôt après l'adjonction de la solution d'enzyme. Après 2 min. d'incubation, 5  $\mu$ l de mélange sont prélevés et chromatographiés sur Partisil SAX, à une pression de 100 atm. (le tampon de chromatographie est le même que déjà décrit). Dès que la chromatographie est terminée (4 à 8 min.), une nouvelle fraction de 5  $\mu$ l

du mélange réactionnel est chromatographiée, et ainsi de suite, pour 4 à 5 aliquotes de 5  $\mu$ l. La quantité de produit formé au cours de la réaction est évaluée à l'aide des courbes d'étalonnages décrites ci-dessus. 5  $\mu$ l d'un blanc, où la solution d'enzyme est remplacée par du tampon, sont aussi chromatographiés pour déterminer la hauteur du pic de produit au temps  $t = 0$ . En effet, les substrats livrés dans le commerce contiennent toujours des impuretés (environ 1 %) dont la nature n'a pas été déterminée avec précision, mais dont le temps de rétention sur HPLC est souvent identique à celui des produits de l'action de la Rnase sur le substrat.

Les vitesses de réaction sont déterminées graphiquement ou par calcul selon (48).

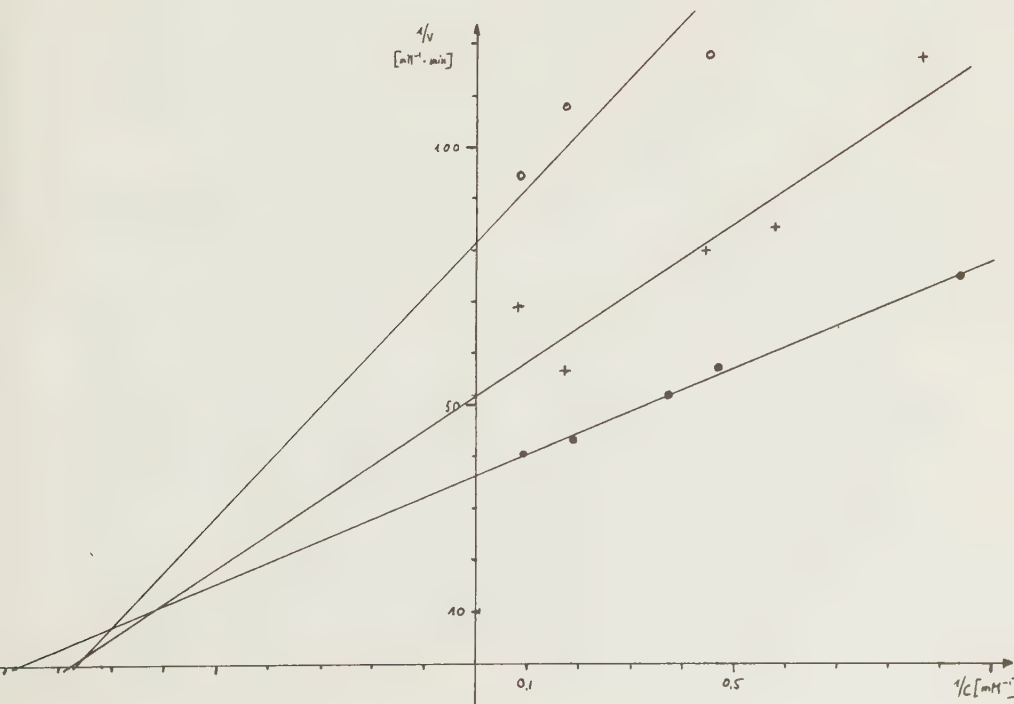
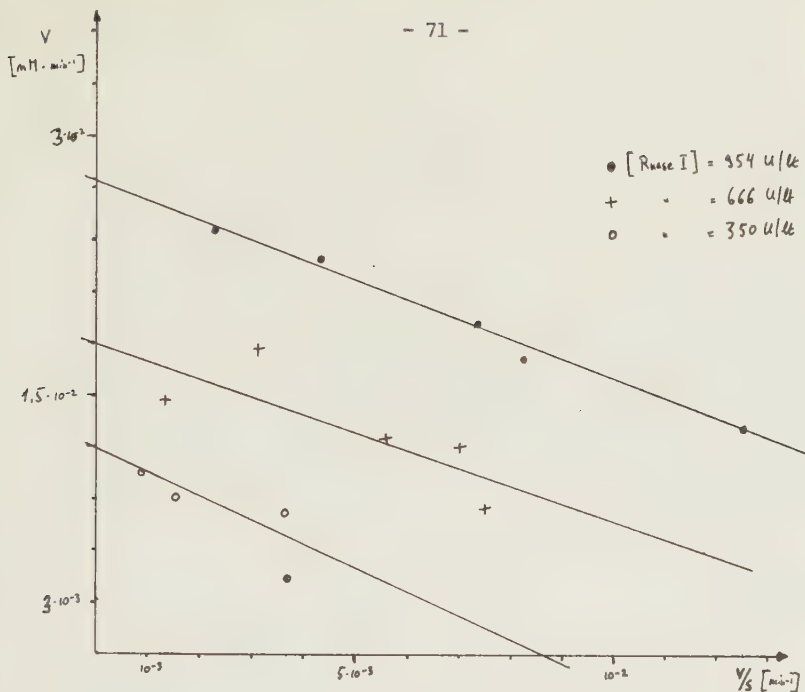
#### b) Résultats

Les constantes de Michaelis  $K_M$  et  $V_{max}$  ont été déterminées pour 5 substrats. Pour chacun d'eux, la réaction a été conduite avec 3 concentrations différentes de Rnase I, et pour chaque concentration de Rnase I, avec 5 concentrations initiales de substrat. Les vitesses initiales de réaction ont été déterminées comme décrit sous "méthode" par dosage des produits de réaction au cours du temps. Les constantes  $K_M$  et  $V_{max}$ , calculées par les méthodes de Lineweaver et Burk et de Eadie, sont données dans le tableau X. Les valeurs de  $K_M$  sont exprimées en millimoles par litre, celles de  $V_{max}$  en nanomoles de produit formé par minute et par unité de Rnase I (il s'agit donc en fait de "turnover-number" ) La réaction observée est l'hydrolyse du cycle 2':3' phosphate avec l'adénosine 2':3' cyclique phosphate comme substrat. Avec les dinucléosides monophosphates comme substrats, cette deuxième étape de la réaction a été négligée et les constantes de Michaelis données dans le tableau X se rapportent donc à la première étape de la réaction catalysée par la Rnase : le transfert du phosphate.

TABLEAU X

| substrat    | $K_M$ (mM)      | $V_{max}$ (nM/min.U.) |
|-------------|-----------------|-----------------------|
| Ado 2':3' P | $3,16^{+1,97}$  | $16,8^{+6,8}$         |
| ApU         | 7,2             | 36,9                  |
| CpC         | $1,39^{+0,49}$  | $30,73^{+4,07}$       |
| UpC         | $1,64^{+0,21}$  | $327,2^{+66,1}$       |
| CpU         | $12,72^{+6,70}$ | $3,5^{+1,6}$          |

La figure suivante donne à titre d'illustration les diagrammes de Eadie et de Lineweaver & Burk obtenus avec le substrat CpC. Les coefficients des droites sont calculés par la méthode des moindres carrés.



#### 4. Détermination des constantes d'inhibition des nucléotides cycliques.

##### a) Méthode.

Les vitesses de coupure de UpC par la Rnase I ont été mesurées en présence de nucléosides 2':3' cycliques phosphates comme ci-dessus, par dosage en fonction du temps des produits de réaction, par chromatographie sur Partisil SAX. Le volume du mélange réactionnel était de 0,1 ml, avec des concentrations variables de substrat et d'inhibiteur. La concentration de Rnase I était de 350 U/lit.

##### b) Résultat.

Les  $K_I$  des 4 nucléosides 2':3' cycliques phosphates ont été calculés avec UpC comme substrat. Pour chaque concentration de substrat (trois concentrations entre 2 et 0,5 mM) la réaction a été examinée avec trois concentration différentes d'inhibiteur (entre 0,9 et 5 mM). Dans chaque cas, les linéarisations selon Lineweaver & Burk et selon Dixon (49) ont été appliquées aux résultats, montrant que l'inhibition de la dégradation de UpC par la Rnase I est compétitive. Les valeurs de  $K_I$ , calculées par régression linéaire, figurent dans le tableau XI. Pour permettre une comparaison plus facile entre les différents nucléosides 2':3' cycliques phosphates, les vitesses initiales relatives pour une concentration en UpC de 1 mM et en nucléotide cyclique de 1 mM ont été ajoutées au tableau.

TABLEAU XI

| inhibiteur | $K_I$ (mM)    | vitesse rel.<br>(100 % = vit.init.sans<br>inhibiteur) |
|------------|---------------|-------------------------------------------------------|
| U > p      | 7,59±3,15     | 67 %                                                  |
| C > p      | 1,98±1,37     | 55 %                                                  |
| A > p      | 0,305±0,103   | 30 %                                                  |
| G > p      | 0,0672±0,0252 | 9 %                                                   |

## 5. Discussion.

Les résultats des mesures cinétiques conduisent à quelques hypothèses quant à la spécificité de la RNase Phy I, même si le nombre de données expérimentales est encore trop réduit pour permettre de formuler un mécanisme catalytique très complet. La différence importante observée entre les vitesses globales de dégradation des dinucléosides monophosphates se reflète dans les valeurs de  $V_{\max}$ , qui se situent dans un éventail très large, soit un rapport de 1 à 100 pour CpU et UpC comme valeurs extrêmes. Une telle différence pour des constantes de vitesse de réactions impliquant vraisemblablement des énergies de liaisons et d'activation catalytique très semblables, suppose une vitesse limitante déterminée par la formation du complexe enzyme-substrat. Deux explications me paraissent plausibles : premièrement, une accessibilité stérique très variable de la liaison ester-phosphorique, où la variation est liée à la nature des nucléosides jouxtant cette liaison, ou deuxièmement, la formation, entre ces nucléosides et le site actif de l'enzyme d'un complexe activé, où l'activation au niveau de la liaison à cliver est plus ou moins favorable à sa rupture selon les nucléosides impliqués.

Les valeurs de  $K_M$  des substrats étudiés montrent l'influence prépondérante de U en P-5' envers l'affinité du dinucléoside pour l'enzyme. Le  $K_M$  passe en effet de  $0,18 \cdot 10^{-3}$  M pour ApC à  $7,2 \cdot 10^{-3}$  M pour ApU, et de  $1,4 \cdot 10^{-3}$  M pour CpC à  $12,7 \cdot 10^{-3}$  M pour CpU. Le nucléoside 3'P, par contre, semble avoir moins d'influence sur l'affinité, comme en témoigne la faible différence entre les  $K_M$  de CpC et de UpC. Enfin, le pouvoir inhibiteur des nucléosides 2':3' phosphates cycliques révèle une plus grande affinité de la RNase Phy I envers les purines qu'envers les pyrimidines, ce qui explique la nette préférence de la RNase I pour les liaisons bornées par une ou par deux purines.

La comparaison de propriétés cinétique de la RNase Phy I avec celles d'autres ribonucléases est possible si on considère que 1 Unité de RNase I représente l'activité totale d'environ  $10^{-11}$  moles d'enzyme (voir chap. II.1). Les valeurs du "turnover number"

sont alors comprises entre  $350 \text{ min}^{-1}$  pour CpU et  $350\,000 \text{ min}^{-1}$  pour UpC, valeurs qu'on peut comparer à celles données pour la RNase pancréatique (50) :  $180\,000 \text{ min}^{-1}$  pour l'hydrolyse de CpA,  $300 \text{ min}^{-1}$  pour l'hydrolyse de C > p,  $2400 \text{ min}^{-1}$  pour UpC; ou pour la RNase T<sub>1</sub> (5) : environ  $600\,000 \text{ min}^{-1}$  pour la rupture de GpC.

Les tentatives d'utilisation de l'équation intégrée de Michaelis pour déterminer les valeurs des constantes cinétiques (45,46) se sont révélées peu fructueuses, car les réactions étudiées semblent faire partie des cas particuliers (48) pour lesquels les erreurs expérimentales affectent gravement la valeur apparente des constantes, ou pour lesquelles l'équation n'est simplement pas applicable. Cependant, les calculs effectués avec ces techniques ont montré que la constante de dissociation  $K_p$  du complexe enzyme-produit est beaucoup plus petite que  $K_M$ , lorsqu'on tire les valeurs de l'équation intégrée, c'est-à-dire lorsque le produit a été formé de novo sous l'action de la catalyse enzymatique. Cette valeur de  $K_p$  (pour  $U > p$  dans le clivage de UpC par exemple) est aussi beaucoup plus petite que la valeur de  $K_I$  de ce même produit ( $U > p$  dans notre exemple), utilisé comme inhibiteur, c'est-à-dire ajouté tel quel au milieu réactionnel avant l'adjonction de l'enzyme. En d'autres termes, tout se passe comme si la vitesse d'éjection du produit hors du complexe enzyme-substrat était la vitesse limitante de la réaction. La constante d'affinité envers l'enzyme (et la capacité inhibitrice) d'un nucléotide cyclique ou d'un nucléoside sera donc plus grande s'il provient de la dégradation du substrat par l'enzyme, et occupe par là une position privilégiée au site actif avec une affinité apparente très importante. S'il est ajouté tel quel au mélange réactionnel, il entretrait alors normalement en compétition avec le substrat, avec une affinité apparente beaucoup plus faible pour le site enzymatique.

## VI. CONCLUSION.

Deux nouvelles ribonucléases ont été isolées et purifiées à partir du milieu de culture de *Physarum polycephalum*. Quelques propriétés physico-chimiques de ces deux enzymes ont été décrites, en particulier leur poids moléculaire, leur point isoélectrique, leur pH et température optimum d'activité. En vue de rechercher une éventuelle application de ces deux RNases dans les travaux de séquence du RNA, leur spécificité à l'égard des diverses bases nucléiques a été examinée en détail par l'analyse des produits de leur action sur tous les dinucléosides monophosphates et sur le RNA. Enfin, des études ont été menées sur la cinétique des réactions catalysées par l'un de ces deux enzymes : la RNase I.

### a) Propriétés moléculaires.

Les poids moléculaires des RNases Phy I et Phy II, déterminés par filtration sur gel, sont respectivement de 25 500 et 24 500. Aucune dimérisation ou subdivision active de la molécule n'a pu être mise en évidence. Le pH optimum (4,5 et 3,1), exceptionnellement bas si on le compare à celui des autres RNases, laisse supposer l'existence d'un mécanisme catalytique différent de celui décrit pour la RNase pancréatique, malgré l'analogie de l'intermédiaire réactionnel 2':3' cyclique. En particulier, la ionisation du substrat (au niveau des bases) et la présence d'un groupement carboxylique au site actif de l'enzyme doivent jouer un rôle important. Les RNases Phy I et Phy II sont stables entre pH 2 et pH 8,5. Leur résistance thermique est plus faible que celle des autres RNases. Une perte d'activité irréversible intervient en effet à partir de 55 °C environ. Il faut souligner par contre la très grande stabilité des solutions de nos enzymes conservés dans le glycérol à 40 % et à -18°C (plus d'une année sans modification de l'activité). Le glycérol, outre sa propriété d'abaisser la constante diélectrique d'un milieu hydrophile, ce qui a pour effet de stabili-

liser les enzymes contenus dans ce milieu, permet de conserver au congélateur une solution en phase liquide.

b) Méthode de préparation.

La préparation des RNases et de la Pase acide ont toujours été faites à partir de 6 litres de milieu de culture de *Physarum* contenant au total environ 6 mg de RNase (et plus d'une centaine de mg de Pase). Une quantité de 1,8 mg de RNase I et de 0,3 mg de RNase II est obtenue au terme de la purification, soit un rendement de 30 % et de 5 % respectivement. La composition du milieu de culture rend impossible l'usage de la chromatographie d'affinité dans les premières étapes de purification, ce qui améliorerait évidemment le rendement. D'autre part, il faut souligner la quantité élevée de Pase acide, dont la méthode de purification décrite ici tient compte, puisqu'elle permet d'isoler conjointement les deux RNases et la Pase acide. L'élimination de toute contamination de nos préparations de RNase par ce dernier enzyme est d'ailleurs une condition préalable indispensable pour une interprétation correcte des données fournies par l'étude de la spécificité des RNases (la Pase acide hydrolyse les liaisons monoester-phosphoriques des nucléotides libérés par la RNase).

c) Spécificité.

La RNase Phy I a la propriété d'attaquer beaucoup plus lentement les liaisons NpU et CpN que les autres liaisons inter-nucléotidiques, avec une résistance particulièrement accrue des liaisons CpU et CpC. Ceci donne à la RNase I un intérêt évident dans l'établissement des séquences d'oligonucléotides riches en pyrimidines résultant de la digestion du RNA par la RNase T<sub>1</sub>. La RNase Phy II scinde rapidement les liaisons GpG et GpA, moins vite les liaisons G-p-Pyd et Pyd-p-Puo, et très lentement les liaisons Pyd-p-Pyd et ApN. Elle permet probablement moins d'applications, car sa préférence pour les liaisons GpN est une caractéristique que possède déjà la RNase T<sub>1</sub>. Par contre, il est possible d'envisager son usage comme complément à la RNase U<sub>2</sub>,

pour isoler des groupes de A dans des séquences de purines, ou encore pour obtenir des oligonucléotides longs dans des conditions d'hydrolyse partielle devant permettre de préserver certains recouvrements.

L'application, en séquence du RNA, de la RNase Phy I reste intéressante, malgré la concurrence d'autres techniques. D'une part, l'usage des méthodes récentes de séquence du DNA (56, 57) présentent certains inconvénients : il n'est en effet pas toujours possible et aisé d'obtenir une "copie DNA" de n'importe quel RNA à l'aide de la DNA-polymérase, et cette copie ne permet pas d'identifier les bases modifiées du RNA. D'autre part, les méthodes chimiques visant à restreindre la spécificité des RNases par substitution de certains groupements sur les bases nucléiques provoquent souvent des pertes trop importantes de matériel.

Enfin, parmi les avantages que présente la RNase Phy I, on peut citer :

- la facilité d'accès du matériel biologique de départ (le *Physarum* est un organisme commun et ubiquiste)
- la possibilité de culture de cet organisme sur une grande échelle, et en utilisant un milieu entièrement synthétique.

L'amélioration du rendement en RNase de la deuxième culture fournie par Ciba permet de supposer que ce rendement peut encore être amélioré, en particulier en essayant d'induire la production de RNase par le myxomycète avec un nutriment approprié. De plus, l'isolement de la seule RNase Phy I, sans vouloir préserver la phosphatase, permettrait sans doute de réduire le nombre d'étapes minimum de purification.

Les propriétés des deux ribonucléases exocellulaires de *Physarum polycephalum* permet de les classer parmi les ribonucléases cyclisantes : EC 2.7.7.17 (polyribonucléotide 2-oligonucléotido-transférases). Sur une suggestion du Dr. Kurt Randerath (communication personnelle), nous proposons de désigner ces enzymes par RNase Phy I et RNase Phy II respectivement.

d) Propositions de recherches.

Les mesures cinétiques effectuées avec la RNase Phy I sont encore trop fragmentaires pour permettre de formuler mieux que des hypothèses sur le mécanisme réactionnel de catalyse de cet enzyme. Des recherches pourraient être poursuivies dans ce but, à la condition de trouver une méthode de purification de l'enzyme plus rapide et plus rentable, afin de posséder suffisamment de matériel pour étudier la réactivité de certains acides aminés (localisation et définition du centre actif de l'enzyme). D'autre part, l'étude de la cinétique de réaction catalysée par les RNases de *P. polycephalum* semble prometteuse, en particulier l'inhibition par les produits de réaction et l'éventuel comportement "allostérique" de l'enzyme monomérique, tel qu'il a été postulé par E.J. Walker (51,52) pour la RNase pancréatique.

Enfin, la position particulière et l'ancienneté des myxomycètes semi-parasites dans la classification des êtres vivants incite à penser qu'il serait particulièrement intéressant de connaître la séquence polypeptidique des RNases Phy I ou Phy II afin de la comparer avec celle de RNases d'autres organismes plus ou moins proche, tel *Aspergillus oryzae* (RNase T<sub>1</sub>) ou très éloignés, comme les mammifères (RNase pancréatique).

BIBLIOGRAPHIE.

- (1) Anfinsen, C.B., Redfield, R.R., Choate, W.L., Page, J., Carroll, W.R., JBC 207 (1954), p.201
- (2) Talbot, D., Yphantis R., Anal. Bioch 44 (1971) p.246
- (3) Conways-Jacob, A., Lewin, L.M. Anal. Bioch.43 (1971),p.394-400.
- (4) Vesterberg, O., in Colowik, S.P. & Kaplan, N.O., "Methods in Enzymology" vol.XXII (1971),p.389-412 (Acad.press N.Y.)
- (5) Uchida T., Egami, F., in Boyer, P.D. "The Enzymes" 3e ed. (1971) p.205 (Acad. press N.Y.)
- (6) Egami, F., Nakamura, K., "Microbial Ribonucleases" (Springer Verlag, 1969)
- (7) Privat de Garihle, M., "Les nucléases" (Hermann, Paris, 1964)
- (8) Kunitz, M.,JBC 164 (1946), p. 563-568.
- (9) Barnard, E.A., Ann. Rev. of Bioch. 38 (1969), p. 677-732.
- (10) Fletcher, P.L., Hash, J.H., Biochemistry 11 (1972), p.4274-4285.
- (11) Torti, G., Mapelli, S., Soave, C., BBA 324 (1973), p.254-266.
- (12) Irie, M., Ohgi, K., J.Biochem.(Tokyo) 80 (1976), p.39-43.
- (13) Rushizky, G.W., Mozejko, J.H., Rogerson, D.L., Sober, H.A., Biochemistry 9 (1970) p. 4966-4971.
- (14) Levy, C.C., Mitch, W.E., Schmulker, M., JBC 248 (1973), p. 5712-5719.
- (15) Levy, C.C., Goldmann, P., JBC 245 (1970), p.3257-3262.
- (16) Levy, C.C., BBA 246 (1971), p. 476-486.
- (17) Woodroof, E.A., Glitz, D.G., Biochemistry 10 (1971), p. 1532-1540.
- (18) Ohgi, K., Irie, M., J. Biochem.(Tokyo) 77 (1975), p.1085-1094.

- (19) Contreras, R., Fiers, W., FEBS Lett. 16 (1971) p.281-283.
- (20) Mazo, A.M., Avdonina, T.A., Mashkova, T.D., BBA 432 (1976), p. 353-360.
- (21) Holley, R.W., Progr. in Nucl. Acid Research, Vol. 8 , p. 37-47.
- (22) Brownlee, G.G., Determination of sequences in RNA.in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology" ed. by Work, T.S., Work, E., North-Holland, American Elsevier, N.Y.
- (23) Braun, R., Behrens,K., BBA 195 (1969) p. 87-98.
- (24) Hiramaru M., Uchida, T., Egami, F., J. Biochem.(Tokyo) 65(1969), p. 693-708.
- (25) Farr, D.R., Amster, H., Horisberger, M., Arch. Mikrobiol. 85 (1972), p. 249-252.
- (26) Schmidt, M., Thèse de doctorat, Université de Genève (1977).
- (27) Daniel, J.W., Baldwin, H.H. in Prescott J. "Methods in cell Physiology", vol. 1,(1964), p. 9-41. (Acad. press N.Y.)
- (28) Farr, D.R., Amster, H., Horisberger, M., Carbohydr.Res. 24 (1972), p.207-209.
- (29) Cuatrecasas, P., in Stark, G.R.(1971) "Biochemical Aspects of reactions on solid support" p. 79-109. Academic Press, N.Y.
- (30) Ackers, J.K., Adv. Prot. Chem. 24 (1970); p. 323-446.
- (31) Hartwick, R.A., Brown, P.R., J. of Chrom. 112 (1975), p. 651-662.
- (32) Laskowsky, M., in "The Enzymes" vol.IV. 3e ed. par Boyer, P.D. p. 313-328.
- (33) Reid, T.V., Wilson, I.B., idem p.373 -415.
- (34) Venkstern, T.V., Baer, A., Spectra of nucleic acid compounds" IFI/Plenum data corp. (1968).
- (35) Braun, R., BBA 142 (1967), p. 267-270.

- (36) IUPAC-IUB Commission on biochemical nomenclature in JBC 245 (1970), p.5171.
- (37) Walz, F.G., Terenna, B., Biochemistry 15 (1976), p. 2837-42.
- (38) Markham, R., Smith, J.D. Biochem. J. 52 (1952) p. 552-557.
- (39) Contreras, R., Fiers, W., Anal. Bioch. 67 (1975) p.319-326.
- (40) Imazawa, M., Irie, M., Ukita, T., J. Bioch.(Tokyo) 64 (1968), p. 595-602.
- (41) Irie, M., idem 65 (1969), p. 133-140.
- (42) " " " " p. 907-913.
- (43) Lineweaver, H., Burk, D., J. Am. Chem. Soc. 56 (1934), p.658.
- (44) Eadie, G.S., JBC 146 (1942), p.85.
- (45) Foster, R.J., Niemann, C., PNAS 39 (1953), p. 999-1003.
- (46) " " J. Am. Chem. Soc. 77 (1955), p. 1886-1892 et p. 5432-5433.
- (47) Muller, W., Talsky, G., Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem. 351 (1970), p. 1564-1570.
- (48) Cornish-Bowden, A., Biochem. J. 149 (1975) p. 305-312.
- (49) Dixon, M., Biochem.J. 55 (1953), p. 170.
- (50) Richards, F.M., Wyckoff, H.W., in Boyer, P.D., "The Enzymes" 3e ed. vol. iv, p. 647-806.
- (51) Walker, E.J., Ralston, G.B., Darvey, I.G., Bioch.J.147(1975) p. 425-433.
- (52) " " " Bioch. J. 153 (1976), p 329-337.
- (53) Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L., Randall, R.J., JBC 193 (1951), p.265.
- (54) Davis, B.J., Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964), p.404.
- (55) Weber, K., Osborne M., JBC 244 (1969), p.4406.
- (56) Maxam, A.M., Gilbert W., PNAS 74 (1977) p.560-564.
- (57) Brownlee, G.G. in Progr.in Nucl. Acid Research, Vol. 17.









